

**Molekularbiologische Untersuchungen zur Verbreitung  
und Physiologie neuartiger, unkultivierter Archaeen  
in kalten Schwefelquellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

– Biologie und Vorklinische Medizin –

der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Christian Rudolph**

aus Nabburg

Regensburg, 2003

**Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. R. Huber**

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.04.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2003

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
	1. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. R. Huber
	2. Gutachter und Prüfer:	Prof. Dr. A. Bresinsky
	3. Prüfer:	Prof. Dr. S. Schneuwly

## **Meinen Eltern**

<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
<b>1. Bezugsquellen.....</b>	<b>14</b>
1.1. Chemikalien .....	14
1.2. Enzyme und Reaktionskits .....	15
<b>2. Puffer und Lösungen .....</b>	<b>16</b>
2.1. DNA-Isolierung (Barns et al.,1994).....	16
2.2. DNA-Reinigung (Koch, 2001).....	16
2.3. Herstellung von Ethidiumbromidplatten .....	17
2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Gelelektrophorese.....	18
2.5. Klonierung von PCR-Produkten.....	18
2.5.1. Klonierung.....	18
2.5.2. Restriktionsverdau .....	19
2.6. Ganzzellhybridisierung.....	19
2.7. Bestimmung des Coenzym F <sub>420</sub> .....	22
2.8. Rasterelektronenmikroskopie .....	22
2.9. CTC-Färbung .....	22
<b>3. Organismen und Kulturbedingungen.....</b>	<b>23</b>
3.1. Organismen .....	23
3.2. Herstellung der Kulturmedien .....	24
3.3. Sterilisation .....	24
<b>4. Mikroskopie .....</b>	<b>24</b>
4.1. Phasenkontrastmikroskopie .....	24
4.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	25
4.3. Fluoreszenzmikroskopie .....	25
4.4. Elektronenmikroskopie.....	26
4.4.1. Probenvorbereitung .....	26
4.4.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	26
<b>5. Messungen und Probenentnahme .....</b>	<b>26</b>
5.1. Messungen physikalischer und chemischer Parameter des Quellwassers .....	26
5.1.1. Temperatur.....	26
5.1.2. pH-Wert.....	27
5.1.3. Sulfidgehalt.....	27
5.1.4. Sauerstoff.....	27



5.1.5. Leitfähigkeitsmessung .....	27
5.1.6. Ionenzusammensetzung .....	28
<b>5.2. Probenentnahme .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. Dokumentation .....</b>	<b>28</b>
<b>6. Mikrosondenmessung in den Perlen .....</b>	<b>29</b>
6.1. Messung der Sauerstoffkonzentration .....	29
6.2. Messung des pH-Wertes .....	29
<b>7. Selektive Anreicherung der SM1-Archaeen aus der Umwelt .....</b>	<b>30</b>
7.1. Percoll-Gradienten .....	30
7.2. Aufwachsen der „Perlenketten“-Strukturen an künstlichen Oberflächen ....	30
7.3. Abschütteln der bewachsenen Netze .....	30
7.4. Selektive Anreicherung der SM1-Archaeen mittels Percoll-Gradienten .....	31
7.5. Entfernung des Percolls .....	31
7.6. Selektive Anreicherung der SM1-Archaeen ohne Percoll-Gradienten .....	32
7.7. Aufbereitung von SM1-Archaeen in gallertartige Strukturen .....	32
<b>8. Isolierung und Aufreinigung von Umwelt-DNA .....</b>	<b>32</b>
8.1. DNA-Isolierung (Barns et al., 1994; modifiziert) .....	33
8.2. DNA-Reinigung (Koch, 2001) .....	33
8.3. Bestimmung der DNA-Konzentration .....	34
8.3.1. Ethidiumbromid-Agarplatten-Methode .....	34
8.3.2. Photometrische Bestimmung .....	35
<b>9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....</b>	<b>36</b>
9.1. Standard-PCR .....	36
9.2. Primer .....	37
9.3. Reamplifikations-PCR .....	37
9.4. Ganzzell-PCR .....	38
9.5. PCR-Screening .....	38
9.6. Lightcycler-PCR .....	38
9.7. PCR der Sulfitreduktasegene .....	39
9.8. Überprüfung des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese .....	39
<b>10. Klonierung .....</b>	<b>40</b>
10.1. Reinigung des PCR-Produktes .....	40
10.2. Durchführung einer Klonierung .....	40
10.3. Screening der Klone nach verschiedenen Restriktionsgruppen .....	41

10.4. Sichern der Klone in Glycerinkulturen .....	41
10.5. Isolierung von Plasmid-DNA .....	41
10.6. Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	42
11. Sequenzdatenanalyse.....	42
12. Ganzzellhybridisierung mit Oligonukleotiden.....	43
12.1. Auswahl der Oligonukleotide und Fluoreszenzfarbstoffe .....	43
12.2. Sondenkonstruktion .....	44
12.3. Beschichtung der Objektträger .....	44
12.4. Fixierung der Zellen .....	45
12.5. Durchführung einer Hybridisierung .....	45
12.5.1. Trägergebundene Hybridisierung .....	45
12.5.1.1. Aufbringen der Zellen .....	45
12.5.1.2. Objektträger .....	46
12.5.1.3. Laserkatapult-Folie .....	47
12.5.2. Hybridisierung in Suspension.....	47
12.6. Färbung der hybridisierten Zellen mit DAPI .....	47
13. Laserkatapult .....	47
14. Bestimmung der Lebensfähigkeit .....	48
14.1. BacLight™-Färbung .....	48
14.2. Bestimmung mit Zellsorter .....	48
15. Methanmessung am Gaschromatographen (GC).....	49
15.1. Probennahme .....	49
15.2. GC-Messung.....	50
16. Bestimmung des Coenzym F <sub>420</sub> .....	50
16.1. Herstellung der Chromatographiesäulen .....	50
16.2. Probenaufarbeitung .....	51
16.3. Nachweis des Coenzym F <sub>420</sub> .....	51
17. CTC-Färbung .....	52
17.1. Kontrollen .....	52
17.2. Probennahme .....	52
17.3. Ansätze.....	53
18. GC-Gehalt .....	54
19. Lipidbestimmung.....	54

<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Untersuchungen zur Verteilung der Archaeen im Sippenauer Moor .....</b>	<b>55</b>
<b>1.1. Beschreibung der Probenahmeorte .....</b>	<b>55</b>
<b>1.2. Entwicklung eines archaeellen Sondengemisches.....</b>	<b>56</b>
<b>1.3. Perlenketten: Strukturen mit erhöhtem Archaeengehalt.....</b>	<b>58</b>
1.3.1. Makroskopisches Erscheinungsbild .....	58
1.3.2. Mikroskopisches Erscheinungsbild des Quetschpräparates .....	59
1.3.2.1. Phasenkontrastmikroskopie .....	59
1.3.2.2. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	61
1.3.2.3. Rasterelektronenmikroskopie .....	63
1.3.3. Modell einer Perle .....	65
1.3.4. Phylogenetische Einordnung der SM1-Archaeen aus den Perlenketten .....	66
<b>2. Direkter Nachweis der phylogenetischen Position des SM1-Archaeons .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1. Entwicklung einer spezifischen Sonde.....</b>	<b>67</b>
<b>2.2. Phylogenetische Einordnung von spezifisch markierten Archaeen aus einer</b>	
<b>Umweltprobe mit einem Laserkatapult am Beispiel der SM1-Archaeen .....</b>	<b>70</b>
2.2.1. Nachweisgrenze bei Ganzzell-PCR.....	70
2.2.2. PCR-Nachweisgrenze von FISH-hybridisierten Zellen .....	72
2.2.2.1. Sondenauswahl (PCR).....	72
2.2.2.2. Nachweisgrenze FISH-hybridisierter Zellen.....	73
2.2.3. Vorversuche zur Vereinzelung der hybridisierten Zellen mit dem	
Laserkatapult .....	75
<b>3. Bestimmung von Umweltparametern.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1. Optodenmessung in den Mikrokompartimenten der SM1-Archaeen.....</b>	<b>76</b>
3.1.1. Ermittlung des pH-Wertes .....	76
3.1.2. Sauerstoff-Gehalt.....	79
<b>3.2. Chemische Wasseranalysen des Sippenauer Moores im Vergleich mit anderen</b>	
<b>Schwefelquellen.....</b>	<b>81</b>
<b>4. Verbreitung der SM1-Archaeen in Schwefelquellen.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1. Beschreibung der Schwefelquellen .....</b>	<b>84</b>
4.1.1. Raum Regensburg .....	85
4.1.1.1. Chemisch-physikalische Parameter .....	85
4.1.1.2. Schwefelquellen .....	88
4.1.1.2.1. Sippenauer Moor .....	89

4.1.1.2.2. Islinger Mühlbach.....	96
4.1.1.2.3. Bad Gögging.....	97
4.1.1.2.4. Sittling .....	100
4.1.1.2.5. Teugn.....	101
4.1.1.2.6. Irnsing.....	103
4.1.1.2.7. Barbing .....	104
4.1.2. Raum Passau.....	106
4.1.2.1. Chemisch-physikalische Parameter.....	106
4.1.2.2. Schwefelquellen .....	107
4.1.2.2.1. Bad Höhenstadt .....	107
4.1.2.2.2. Pilzweg .....	109
4.1.3. Raum Garmisch-Partenkirchen.....	111
4.1.3.1. Chemisch-physikalische Parameter.....	111
4.1.3.2. Schwefelquellen .....	112
4.1.3.2.1. Hartsteinwerke bei Eschenlohe .....	112
4.1.3.2.2. Eschenlohe.....	114
4.1.3.2.3. Stinkergraben.....	116
4.1.3.2.4. Kochelberg.....	117
4.1.4. Türkei .....	119
4.1.4.1. Schwefelquelle .....	119
4.1.4.2. Chemisch-physikalische Parameter.....	120
<b>4.2. FISH-Analysen.....</b>	<b>121</b>
<b>4.3. Phylogenetische Analysen .....</b>	<b>123</b>
4.3.1. Klonierungen .....	123
4.3.1.1. Islinger Mühlbach.....	123
4.3.1.2. Bad Gögging.....	124
4.3.1.3. Sittling .....	126
4.3.1.4. Pilzweg .....	127
4.3.1.5. Bad Höhenstadt .....	129
4.3.1.6. Hartsteinwerke bei Eschenlohe .....	132
4.3.1.7. Dalyan/Türkei.....	133

4.3.2. Phylogenie .....	135
4.3.2.1. SM1-Gruppe .....	135
4.3.2.2. Crenarchaeota .....	137
4.3.2.3. Methanogene Archaeen .....	139
<b>5. G+C-Gehaltsbestimmung des SM1-Genoms .....</b>	<b>140</b>
<b>6. Physiologie der neuartigen SM1-Archaeen aus den Perlenketten .....</b>	<b>141</b>
<b>6.1. Bestimmung der Lebensfähigkeit .....</b>	<b>141</b>
6.1.1. SM1-Archaeen in den Kugeln .....	141
6.1.2. Aufkonzentrierte SM1-Archaeen .....	142
<b>6.2. Messung von Methan in der Gasphase „älterer“ Perlen .....</b>	<b>143</b>
6.2.1. Probenahme gasgefüllter Perlen .....	144
6.2.2. Methanbestimmung der Gasphase .....	144
<b>6.3. Sulfitreduktase .....</b>	<b>145</b>
<b>6.4. Bestimmung des Coenzym F<sub>420</sub> .....</b>	<b>146</b>
6.4.1. Kontrollen .....	146
6.4.2. F <sub>420</sub> -Gehalt der Mikroorganismen in den Perlen .....	147
6.4.3. Coenzym F <sub>420</sub> aufkonzentrierter SM1-Archaeen .....	148
<b>6.5. Ableitung möglicher Stoffwechselumsätze mittels CTC .....</b>	<b>149</b>
6.5.1. CTC-Kontrollen .....	149
6.5.2. Substrate .....	153
<b>7. Lipidanalyse .....</b>	<b>157</b>
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>159</b>
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>171</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>173</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
a.d.	an der
ADR	ARB-Datenbank Regensburg
al.	alii
bidest	zweimal destilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C <sub>org</sub>	Mischung organischer Bestandteile
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ed.	Editor
eds.	Editoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
entf.	entfällt
entn.	entnommen
evtl.	eventuell
F	vorwärts
GC	Gaschromatograph
G+C	Guanin, Cytosin
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Pa	Pascal
l	Liter
λ	Wellenlänge
m	Meter
M	molar
min	Minuten
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
N	normal
o.a.	oben angegeben
O.D.	Optische Dichte
pers. Mitt.	Persönliche Mitteilung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	pondus hydrogenii (Wasserstoff-Exponent)
PHB	Poly-β-Hydroxybuttersäure
Prof.	Professor
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
R	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

s	Sekunden
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur der DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZ	Tischzentrifuge
U	Units
unverd.	unverdünnt
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.T.	zum Teil
Ø	Durchmesser

### Numerische Kürzel:

G	giga	10 <sup>9</sup>
M	mega	10 <sup>6</sup>
k	kilo	10 <sup>3</sup>
m	milli	10 <sup>-3</sup>
µ	mikro	10 <sup>-6</sup>
n	nano	10 <sup>-9</sup>
p	pico	10 <sup>-12</sup>
f	femto	10 <sup>-15</sup>

### IUPAC-Code für Nukleotide:

A	Adenin
B	G/C/T
C	Cytosin
D	A/G/T
G	Guanin
H	A/C/T
K	G/T
M	A/C
N	A/C/G/T
R	A/G
S	G/C
T	Thymin
U	Uracil
V	A/G/C
W	A/T
Y	C/T

## I. Einleitung

Schon die frühesten Mythen und Überlieferungen des abendländischen Kulturkreises ranken sich um das Element Schwefel. Die auffallende gelbe Farbe, das Auftreten in Verbindung mit zerstörerischen Naturgewalten (Vulkanismus), schwelende und brodelnde Solfatarenfelder, begleitet von dem unangenehmen Geruch nach Verwesung, ließen wohl einen Zusammenhang mit dem Bösen und/oder der Strafe Gottes vermuten. So wurde schon im Alten Testament Schwefel als Element des Todes und des Verderbens beschrieben. Gottes Zorn über Hochmut, Gottlosigkeit und alle Sünden brach über Sodom und Gomorrha durch einen Regen aus Schwefel und Feuer (1. Mose 19; 24, 25) herein und ließ die Erde Edoms zu Schwefel werden (Jesaja 34, 8-10).

Vorrömische, italische Völker belegten die faszinierenden, unerklärbaren Phänomene, die mit den Vorkommnissen des Schwefels einhergehen, mit einer göttlichen Eigenschaft. Die Gottheit Mephitis wurde geschaffen, deren Wesen sich in giftigen, insbesondere schwefligen Ausdünstungen des Bodens und somit auch in der Existenz von Schwefelquellen äußert <sup>141</sup>. In Anlehnung daran griff Goethe wohl den noch heute gültigen Begriff mefitisch – verpestend, stinkend – bei der Namensgebung des Teufels Mephisto in Faust wieder auf. Bezeichnenderweise werden auch Stinktiere, die bei Gefahr übelriechende Schwefelverbindungen (Mercaptane) ausscheiden, ähnlich tituliert, indem sie in der Unterfamilie *Mephitinae* mit dem Gestreiften Stinktier (*Mephitis mephitis*) zusammengefasst werden.

Der unverwechselbare Geruch des Schwefels oder seiner Derivate wird darüber hinaus in alten Sagen als Merkmal des Teufels beschrieben, der dadurch stets enttarnt wird <sup>123</sup>. Es ist somit nicht verwunderlich, dass sich gerade um Schwefelquellen viele Sagen und Erscheinungen ranken. Zwei Geschichten – „Die lange Agnes“ und „Die feurigen Männer“ – berichten von ruhelosen, unheimlichen Seelen, die an der Schwefelquelle in Bad Abbach umherirren <sup>171</sup>.

Über die mythologische Bedeutung hinaus besitzen Schwefelquellen kulturhistorisch wichtige Einflüsse. Archäologische Untersuchungen im Raum Bad Gögging zeigten, dass diese Gegend schon in der jüngeren Steinzeit besiedelt war. Eine erste sichtbare Siedlungsform konnte durch das Auffinden einer keltischen Fliehburg nachgewiesen werden. Da die Kelten im Wasser und besonders in den Quellen den Inbegriff allen Lebens sahen, stellten die - durch Aussehen und Geruch - auffälligen Schwefelquellen eine hervorragende Gelegenheit dar, ihrem Quellenkult zu frönen. Es ist zu vermuten, dass auch die positiven, medizinischen

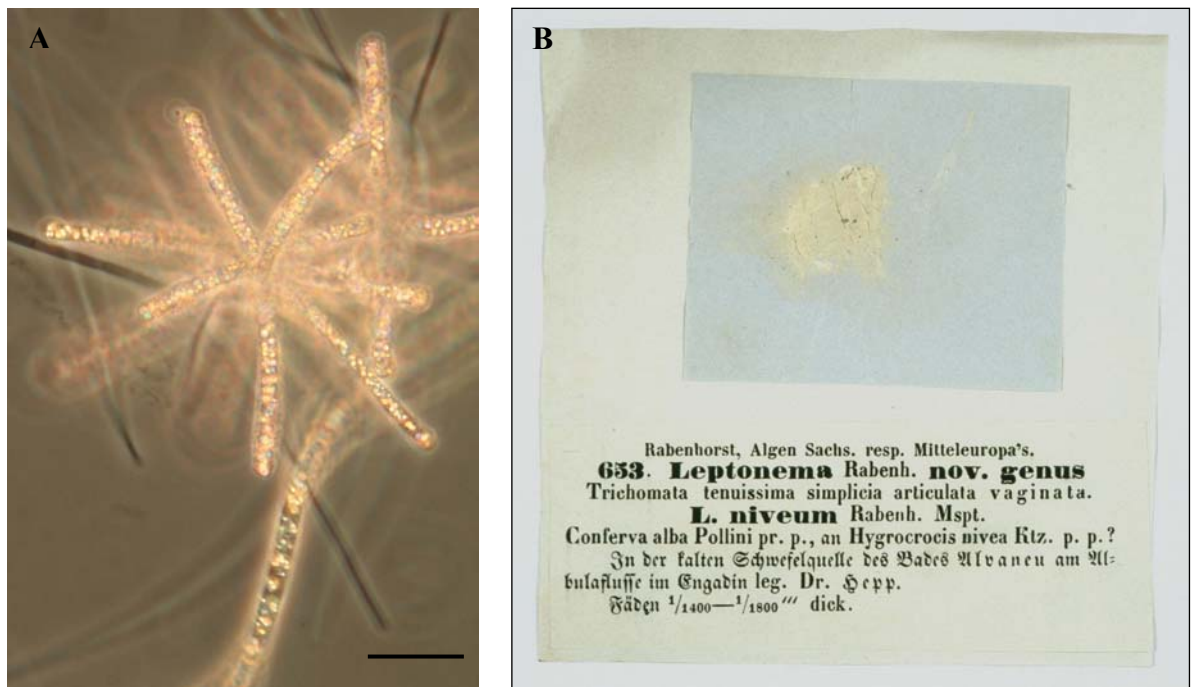


Wirkungen der Schwefelquellen schon von den Kelten erkannt wurden. Ein Badebetrieb mit breiten, gemauerten Becken und verwinkelten Heizkanälen wurde jedoch erst von den Römern erbaut und genutzt. Die medizinische Nutzung der Schwefelquellen Bad Göggingen erfolgt also spätestens seit dem ersten Jahrhundert nach Christus bis heute <sup>147</sup>. Während im Mittelalter die Behandlung von Hautkrankheiten, Krätze oder später Syphilis in Schwefelbädern erfolgte <sup>97</sup>, gibt es heute weitere zahlreiche medizinische Indikationen: Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Arthrosen, Wirbelsäulenschäden, Weichteil- und degenerative Nervenentzündungen, chronische Ekzeme, sowie chronische Unterleibsentzündungen bei Frauen <sup>152</sup>. Die vielen genutzten Schwefelquellen Deutschlands besitzen eine große Bedeutung bei Kuraufenthalten und stellen somit einen wichtigen Wirtschaftsfaktor dar. So tragen sie zu einem großen Teil der jährlichen Übernachtungen bei (ca. 28 Millionen), die alleine die bayerischen Heilbäder verbuchen <sup>176</sup> und liegen mit ihrem Beitrag an dritter Stelle der bayerischen Volkswirtschaft (Hr. Gnan, Bayerischer Heilbäderverband; pers. Mitteilung).

Schwefelquellen besitzen ausnahmslos einen charakteristischen Geruch nach Schwefelwasserstoff und sind makroskopisch durch weiße Beläge gekennzeichnet. Diese sind von Alters her bekannt und wurden lange Zeit für eine leblose organische Substanz gehalten, welche sich aus dem Wasser niederschlägt <sup>195</sup>. Die Erkenntnis, dass diese weißen schleimigen Massen hauptsächlich aus filamentösen Schwefelbakterien bestehen, erweckte schon früh das Interesse von bedeutenden Mikrobiologen wie Sergius Winogradsky oder Ludovico Rabenhorst <sup>144,191-197</sup>.

In einem Exsiccata (Rabenhorst Alg. N. 653; Abb. 1B) <sup>143</sup>, das bisher als vermisst galt, erfolgte bereits vor 1865 durch Rabenhorst die erste Klassifizierung eines filamentösen „Schwefelbakteriums“ aus einer Schwefelquelle des Berner Oberlandes. Dieser als *Leptonema nivea* bezeichnete Organismus, wurde 1865 als *Beggiatoa nivea* klassifiziert <sup>144</sup>. Eine weitere Umbenennung erfolgte durch Winogradsky's Beschreibung der Gattung *Thiothrix* mit *Thiothrix nivea* als Typspezies <sup>197</sup>. Winogradsky identifizierte bereits im Jahr 1887 den Stoffwechsel dieser „Schwefelbakterien“ durch sehr genaue Beobachtungen als autotrophe Schwefelwasserstoff-Oxidation. Die kritische Bewertung eigener Ergebnisse führte so zur Widerlegung der von Cohn aufgestellten These, dass diese Organismen H<sub>2</sub>S bilden würden <sup>36</sup>. Die morphologische Beschreibung Winogradsky's entspricht genau der heute als *Thiothrix nivea* beschriebenen Art, einem filamentbildenden Organismus, der von einer Scheide umgeben wird <sup>101</sup>. Diese Filamente heften sich mittels einer nicht näher

bekannten Substanz mit einem Polende an eine feste Matrix, während die Abschnürung von beweglichen Gonidien an dem entgegengesetzten Ende stattfindet. Morphologisch auffallend sind die unter dem Phasenkontrast-Mikroskop stark lichtbrechenden Schwefeleinlagerungen innerhalb der Zellen und die Tendenz der Filamente, Rosetten auszubilden (Abb. 1A). Deren Entstehung wird über einen Lebenszyklus postuliert <sup>101</sup>. Erst vor kurzem erfolgte die Einordnung von vier, bisher nur physiologisch beschriebener Isolate mittels 16S rRNA-Gensequenzvergleichen <sup>79</sup>. Zwei weitere Arten konnten durch vergleichende Untersuchungen abgegrenzt werden <sup>13</sup>, wodurch man heute sieben Arten dieser Gattung zuordnet. Mit dem chemolithoautotrophen *Thiothrix ramosa* <sup>127</sup> und *Thiothrix arctophila* <sup>50</sup> bestehen zwei weitere, teilweise unzureichend charakterisierte Isolate dieser Filamentbildner.



**Abb. 1:** (A) Rosette von *Thiothrix* mit Schwefeleinlagerungen. Maßstab: 10µm.  
(B) Exsiccatenblatt von Rabenhorst; erster Nachweis von *Thiothrix*, damals noch als *Leptonema niveum* klassifiziert

Die Fähigkeit von Mikroorganismen, sich an feste Oberflächen anzulagern wurde 1933 auch von Henrici beobachtet. Er brachte Glasobjektträger als Aufwuchsmaterial in Seen aus. Die daran aufgewachsenen Zellanhäufungen ließen Henrici eine hohe Mikroorganismendichte in Gewässern vermuten, wobei sich die größte Anzahl der Organismen an submersen Oberflächen anzuheften schien. Daraus folgerte er, dass derartiges Wachstum in mikrobiellen Lebensgemeinschaften stattfindet <sup>75</sup>. Dieses Aufwuchsverhalten wurde durch Beobachtungen an im Meer versenkten Oberflächen bestätigt <sup>207</sup>. Mikrobielle Populationen, die aneinander

und/oder an festen Oberflächen anhaften, sowie in eine sog. Matrix eingebettet sind, werden als Biofilme bezeichnet <sup>37,38,187,190</sup>. Der Bildungsprozess derartiger Strukturen ist abhängig von den daran beteiligten Mikroorganismen. Frei bewegliche Zellen einer Spezies haften zunächst an Grenzflächen zweier oder mehrerer Medien an und bilden eine Schleim- oder Polymerschicht, die wiederum als Anheftungsmaterial oder Substrat für weitere Spezies dienen kann <sup>126</sup>. Auf diese Weise können heterogene Biofilme aus verschiedenen Mikroorganismen entstehen, die in eine extrazelluläre Matrix aus abgesonderten Polymeren, wie Polysaccharide und Proteine, aus Stoffwechselprodukten und Nährstoffen, aus Bestandteilen lysierter Zellen und sogar aus Partikeln der unmittelbaren Umgebung eingebettet sind <sup>172</sup>. Der An- und Abtransport von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Signalstoffen wird häufig durch eine Vielzahl wassergefüllter Poren und Kanäle in der Matrix ermöglicht <sup>35,90,172</sup>. Das Zusammenleben in Lebensgemeinschaften bringt für die beteiligten Mikroorganismen oftmals entscheidende Vorteile, wie ein erhöhtes Nahrungsangebot, sowie die Möglichkeiten zur Besiedelung ökologischer Nischen, zu gerichteter Bewegung, zum Gentransfer oder den Schutz vor antimikrobiellen Agenzien <sup>41,108,169,187</sup>. Je nach Art der Wechselwirkungen und der Enge des Zusammenlebens der beteiligten Mikroorganismen unterscheidet man zwischen mikrobiellen Matten und Biofilmen, Kommensalismen und Metabiosen, Syntrophien und Konsortien <sup>136,155</sup>. Die Ausbildung von Biofilmen wird in der Natur vielfach beobachtet <sup>137</sup> und beschränkt sich nicht nur auf Schwefelquellen, auch wenn sie dort besonders auffällig sind. Sie besiedeln vielmehr alle Arten von natürlichen, festen Oberflächen, wie Steine, Blätter oder auch Holz in den unterschiedlichsten Biotopen. Aber auch Materialien aus Metallen und Kunststoffen, wie z.B. Implantate, medizinische Katheter oder Wasserleitungen, werden von Biofilmen besiedelt, welche dort eine Reihe medizinischer bzw. technischer Probleme verursachen <sup>18,170</sup>.

An der Entstehung von Biofilmen können Vertreter aller drei Domänen, in die sich das Leben auf der Erde einteilen lässt <sup>201</sup>, beteiligt sein. Durch Strukturvergleiche auf molekularer Ebene unterscheidet man die Domäne der Eukaryonten von den beiden prokaryontischen Domänen Archaeen und Bakterien <sup>202</sup>. Die Prokaryonten weisen dabei die größte organismische und stoffwechselphysiologische Vielfalt unter den Lebewesen der Erde auf. Obwohl sie maßgeblich an den wichtigsten Stoffkreisläufen, wie dem Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Kreislauf beteiligt sind, stellen sie innerhalb der Biosphäre der Erde zugleich die am wenigsten verstandene Gruppe dar <sup>43</sup>. Man nimmt an, dass aus den verschiedenen Ökosystemen durch Kultivierung bisher weniger als 1% der prokaryontischen Organismen als Reinkultur erhalten werden konnten <sup>5,56,100,131,185</sup>. Mit neueren, molekularbiologischen

Methoden kann heute die prokaryontische Diversität von verschiedenen Biotopen kultivierungsunabhängig erfasst werden<sup>128,132,189</sup>. Dabei wird die 16S ribosomale RNA (16S rRNA) als Unterscheidungs- und Einteilungsmerkmal herangezogen. In phylogenetischen Analysen kann somit ein PCR-Primer-abhängiger Einblick in die Diversität einzelner Biotope gewonnen werden<sup>86,128,131,133,163</sup>.

Die Domäne der Archaeen wird auf molekularer Ebene in vier Reiche unterteilt, das Reich der *Crenarchaeota*, der *Euryarchaeota*, der *Nanoarchaeota* und der *Korarchaeota*<sup>14,80,202</sup>. Während von den *Korarchaeota* bisher nur 16S rRNA Gensequenzen bekannt sind<sup>14,15</sup>, konnte aus dem Reich der *Nanoarchaeota* bereits ein hyperthermophiler Vertreter in symbiontischer Kokultur erhalten werden<sup>80</sup>. Dem Reich der *Euryarchaeota* gehören vor allem extrem halophile und methanogene Organismen, aber auch die hyperthermophilen Gattungen *Archaeoglobus*, *Ferroglobus*, *Pyrococcus* und *Thermococcus* an<sup>167</sup>. Innerhalb der *Crenarchaeota* konnten bisher nur thermophile oder hyperthermophile Isolate mit optimalem Wachstum zwischen 80°C und 105°C erhalten werden. In den letzten 20 Jahren wurden verschiedenste Gruppen hyperthermophiler Archaeen aus terrestrischen Solfatarenfeldern oder marinen Hydrothermalgebieten isoliert, was auf eine hohe mikrobielle Diversität in diesen extremen Lebensräumen hindeutet<sup>166</sup>.

Durch phylogenetische Analysen konnte in den letzten 10 Jahren eine weite Verbreitung der *Archaea* auch in Biotopen mit gemäßigten Temperaturen gezeigt werden. Archaeelle 16S rRNA Sequenzen wurden in den Ozeanen<sup>42,63,114</sup>, den Polarmeeren<sup>111,120</sup>, marinen Sedimenten<sup>93,182</sup>, hochsalinen Brinebecken-Sedimenten<sup>52</sup>, Grubenwässern<sup>173</sup>, Süßwasserseen<sup>34</sup> und Sedimenten<sup>76,113,157</sup>, sowie in terrestrischen Böden<sup>89,177</sup>, an Reiswurzeln<sup>70,98,145</sup> und in marinen Vertebraten<sup>180</sup> bzw. Invertebraten<sup>115,138,110</sup> nachgewiesen. Sowohl die vorherrschenden Bedingungen der untersuchten Biotope als auch der niedrige G+C-Gehalt der 16S rRNA dieser Archaeen deuten auf ein Vorkommen dieser Organismen bei zumindest gemäßigten Temperaturen. Mit 51 mol% liegt der G+C-Gehalt in der „Marine Group I“ beispielsweise deutlich unter dem bisher kultivierter, hyperthermophiler *Crenarchaeota* (63mol% bis 67mol% G+C)<sup>42,200</sup>. Quantitative rRNA-Hybridisierungen zeigen, dass die archaeelle 16S rRNA im marinen Picoplankton 5% - 35%<sup>42,47</sup> und im Küstengewässer der Antarktis bis zu 34 % der prokaryontischen rRNA ausmacht<sup>47</sup>. Nach neueren Untersuchungen, in welchen von einer Gesamtzellzahl von  $4,4 \times 10^{28}$  Prokaryonten in den Weltmeeren ausgegangen wird, wird der Anteil der Archaeen darin sogar auf  $1,3 \times 10^{28}$  Zellen hochgerechnet<sup>91</sup>. Dies deutet auf eine entsprechende ökologische Relevanz der Organismen in diesen Biotopen. Den vielen 16S rRNA-Sequenzdaten kälteliebender

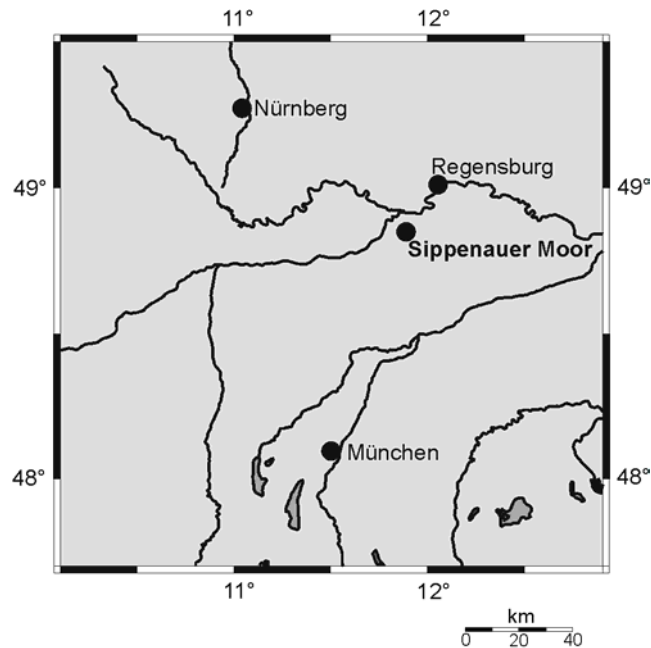
Archaeen stehen nur sehr wenige morphologische Beobachtungen gegenüber. Eine Methode, die sowohl die morphologische Untersuchung als auch die Identifikation und phylogenetische Einordnung morphologisch intakter Zellen aus verschiedensten Ökosystemen ermöglicht, stellt die sog. Ganzzellhybridisierungen (FISH = Fluoreszenz in situ Hybridisierung) dar. Hierbei werden synthetische, fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Oligonukleotide, die der ribosomalen rRNA komplementär sind, als molekulare Werkzeuge eingesetzt, um die in vielen Kopien vorliegenden 16S rRNA der Organismen gezielt zu markieren und die Zellen sichtbar zu machen<sup>3-5,8,46,164</sup>. Durch die Entwicklung verschiedenster, spezifischer Sonden, die eine Einordnung von der Ebene der Domäne bis zu einzelnen Spezies zulassen, kann die mikrobielle Zusammensetzung und die Verteilung der Mikroorganismen in ihren Biotopen aufgeklärt werden<sup>31,39,62,109,138,151,161</sup>. Viele neue bakterielle Gruppen konnten mit dieser Methode bereits identifiziert werden, ohne diese zu kultivieren. In wenigen Untersuchungen wurde diese Technik auch auf kälteliebende Archaeen angewandt. Der Vergleich der FISH-gefärbten Archaeen mit der durch den DNA-Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylidole) ermittelten Gesamtzellzahl einer Probe der französischen Mittelmeerküste aus 200 m Tiefe ergab einen Anteil von 60% Archaeen<sup>64</sup>. In einem marinen Sediment des Arktischen Ozeans hingegen konnten nur bis zu 4,9% Archaeen gefunden werden<sup>146</sup>. Der Einsatz von fluoreszenzfarbstoff-markierten Polynukleotiden ermöglichte den spezifischen Nachweis von *Crenarchaeota* der „Marine Group I“ und *Euryarchaeota* der „Marine Group II“ im Pazifik bis zu einer Tiefe von 3400 m<sup>45</sup>. Die Ganzzellhybridisierung ermöglicht direkte Einblicke in die verschiedensten Biotope und deren mikrobielle Zusammensetzung. So sind beispielsweise an der Rhizosphäre von Tomaten *Crenarchaeota* (3,3% Zellanteil)<sup>161</sup> und aus einem anaeroben Ciliaten symbiotische Methanogene identifiziert worden<sup>53</sup>. Darüber hinaus gelang zwar in einem finnischen Waldsee mittels FISH die Identifizierung von *Euryarchaeota* (bis zu 7% des gesamten Bakterioplanktons), schlug aber für *Crenarchaeota* fehl. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu phylogenetischen Analysen, anhand derer eine Vielzahl unkultivierter, crenarchaeeller Sequenzen dort nachgewiesen werden konnte<sup>88</sup>. Der erste FISH-Nachweis mit einer spezifischen Sonde von unkultivierten, psychrophilen *Crenarchaeota* erfolgte in einem marinen Schwamm der Art *Axinella mexicana*<sup>138</sup>. Dieses, als *Cenarchaeum symbiosum* bezeichnete, stäbchenförmige Archaeum konnte sowohl in Schwämmen geographisch verschiedener Standorte, als auch in Exemplaren, die mehrere Jahre bei 10°C im Aquarium gehalten wurden, nachgewiesen werden. Das wiederholte Auffinden der kälteliebenden *Crenarchaeota* mittels FISH in marinen Schwämmen auch anderer Arten, lässt ein enges Zusammenleben vermuten<sup>61,110</sup>. Erst vor kurzem wurden auch

mikrobielle Konsortien entdeckt, die sich aus Archaeen der Ordnung Methanosarcinales und sulfatreduzierenden Bakterien der  $\delta$ -Proteobacteria zusammensetzen<sup>21</sup>. Diese Assoziationen treten in sehr hoher Dichte in marinen, gashydrat-reichen Sedimenten auf und scheinen anaerob Methan zu oxidieren<sup>21,129</sup>. Weitere Untersuchungen zur Verbreitung dieser Konsortien zeigten, dass sie sogar bis zu 4m hohe Mikrobenriffe im Schwarzen Meer aufbauen können<sup>116</sup>.

Obwohl unkultivierte, meso- bis psychrophile Archaeen in einer wachsenden Anzahl neuer Biotope nachgewiesen werden können und bei Quantifizierungen häufig einen erheblichen Anteil an der Gesamtmikrobenpopulation ausmachen, war es bisher nicht möglich, einen Vertreter dieser neuartigen Sequenzgruppen zu isolieren. Sogar der Einsatz neuentwickelter Kultivierungstechniken, wie z. B. das Lasermikroskop, bei dem einzelne Organismen unter optischer Kontrolle vereinzelt werden können<sup>82, 83</sup>, schlug fehl. Bisher wurden nur meso- bis psychrophile Isolate mit schon bekanntem Stoffwechsel und naher Verwandtschaft zu kultivierten Vertretern dieser Gruppen erhalten. Neben mesophilen, halophilen *Archaea* gelang bisher lediglich die Isolierung von drei psychrophilen bis psychrotoleranten Isolaten innerhalb der euryarchaeellen Methanogenen: *Methanococcoides burtonii*<sup>60</sup>, *Methanogenium frigidum*<sup>59</sup> und *Methanosarcina lacustris*<sup>160</sup>. Somit ist zumindest innerhalb der Methanogenen ein Vergleich der kalten Vertreter mit den thermophilen Isolaten auf molekularer, biochemischer oder ökologischer Ebene möglich<sup>155,174</sup>. Im Gegensatz dazu gibt es sehr wenige Untersuchungen zur Physiologie von Vertretern der unbekannten, archaeellen Gruppen.

Durch Vergleiche von spezifischen Merkmalen bereits kultivierter Archaeen mit Umweltanalysen kalter Biotope wird versucht, Aufschlüsse über deren bisher unbekannte Kohlenstoff- und Energiequellen zu erhalten. Einen derartigen archaeellen Marker stellen beispielsweise die Membranlipide dar, die sich von C<sub>20</sub>-Isoprenydiether (Phytanyldiether) und dessen Tetraether-Dimeren ableiten und sich von den Acylester-Lipiden der *Bacteria* und *Eucarya* vollkommen unterscheiden<sup>92</sup>. Aus Isotopenanalysen von in marinen Sedimenten nachgewiesenen cyclischen und acyclischen Phytanyletherlipiden, schließt man bei psychrophilen *Archaea* auf eine Kohlenstoffquelle mit schweren Isotopen wie Kohlenhydrate bzw. Proteine aus Algen oder gelöstes Hydrogencarbonat<sup>77</sup>. Diese Organismen werden auch als hauptsächliche Quelle von Tetraetherlipiden vermutet, die im antarktischen Plankton nachgewiesen werden konnten<sup>44</sup>. FISH-gekoppelte mikroautoradiographische Untersuchungen (STARFISH) mit radioaktiv markierten Aminosäuren zeigten bei *Archaea* des marinen Planktons erstmals physiologische Aktivität durch die Umsetzung eines Substrates<sup>130</sup>.

Biochemische Daten der neuartigen Archaeen konnten bisher nur ansatzweise durch die Charakterisierung einer DNA-Polymerase aus dem unkultivierten *Cenarchaeum symbiosum* gewonnen werden<sup>158</sup>. Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Sequenzieren von kleinen, das 16S rRNA-Gen beinhaltenden Abschnitten des Genoms, ohne jedoch zu wissen, ob die Stoffwechselfunktionen der nachgewiesenen Gene auch aktiv sind<sup>140,156,165</sup>.



**Abb. 2:** Die Lage des Sippenauer Moores bei Regensburg (aus<sup>153a</sup>).

Am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg stellt in der Arbeitsgruppe Prof. R. Huber die mikrobielle Analyse kaltgemäßigter Schwefelquellen im Bayerischen Raum mit einem Hauptaugenmerk auf *Archaea* einen Forschungsschwerpunkt dar. Im Mittelpunkt stehen hierbei seit 1997 Arbeiten im Sippenauer Moor bei Saal a.d. Donau. Dieses Moor, ein grundwassergespeistes Niedermoor, wurde nicht entwässert und, bis auf eine Nutzung als Streuwiese, nicht wie die großen Niedermoore Bayerns (das Donaumoos, das Erdinger Moos und das Dachauer Moos) kultiviert. So konnte die besondere Flora und Fauna dieses Gebietes weitestgehend erhalten bleiben. Bereits im Jahr 1911 wurden von der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft Teile des Moores zu dessen Erhaltung angekauft. Die Erklärung zum Naturschutzgebiet erfolgte 1939. Im Jahr 1990 erwarb die Regensburgische Botanische Gesellschaft auch die Restfläche, so dass sich seitdem das gesamte Naturschutzgebiet mit einer Fläche von 8,271 ha in ihrem Besitz befindet<sup>23-25</sup>. Der umgebenden Wald (ca. 8 ha) wurde schließlich im Jahr 2002 von der Gemeinde Saal a.d. Donau aufgekauft und der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft übertragen (Prof. A. Bresinsky, pers. Mitteilung).

Viele der dort vorkommenden Pflanzen stehen heute auf der Liste der „Gefährdeten Pflanzengesellschaften“<sup>23-25,186</sup>. Das Sippenauer Moor ist als typischer Vertreter der Niedermoore stark von einem hohen Grundwasserspiegel abhängig. Dieser wird allerdings in Saal a.d. Donau, nur 1,5 Kilometer vom Sippenauer Moor entfernt, künstlich gesenkt, um den Kalk-Abbau des Kalkwerkes Saal a.d. Donau zu ermöglichen, das in tieferen Schichten wirtschaftlich besonders wertvolles Material fördern kann<sup>24</sup>. Eine langjährige gerichtliche Auseinandersetzung der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft mit dem Kalkwerk Saal a.d. Donau um diese Grundwasserabsenkung konnte im Jahr 2002 durch einen Vergleich beendet werden<sup>25</sup>. Allerdings scheint es fraglich, ob durch die darin getroffenen Vereinbarungen das gesamte Moor dauerhaft geschützt wird<sup>25</sup>.

Das Sippenauer Moor liegt im Landkreis Kelheim, Regierungsbezirk Niederbayern, am Feckinger Bach zwischen Sippenau und Mitterfecking oberhalb der Einmündung des Esperbaches (Abb. 2; <sup>23</sup>). Das Relief des Gebietes wurde im Quartär durch den Verlauf der Ur-Donau vorgegeben, und im Holozän durch Anhäufung von Malm-Relikten und Abschlammkiesen stärker ausgeprägt. Diese Entwicklung wurde vor allem durch die Thaldorfer-Feckinger Hauptstörung massiv beeinflusst, wobei der südliche Teil zwischen Esper und Feckinger Tal um 50 m abgesenkt wurde. Auf diese Bruchzone sind die scharfen Weißjuraklüftungen zurückzuführen, die das Gebiet im Süden und Südwesten, sowie im Norden und Nordosten umgeben<sup>188</sup>. Aus diesen entspringen, bis zu 2 m über dem Talboden, Malmkarstquellen, die teilweise Schwefelwasserstoff enthalten. Die in diesem Gebiet vermehrt vorkommenden H<sub>2</sub>S-Quellen gaben vermutlich der Ortschaft Sippenau ihren Namen. Sippenau leitet sich vom mittelalterlichen Wort „sippen“ ab, was soviel bedeutet wie stinken, übel riechen<sup>149</sup>.

Auf der Fläche des Sippenauer Moores entspringen ungefähr zwanzig Quellen und Quellaushübe. Die Hauptquelle speist einen ca. 7m x 4m großen Quelltopf, in den mindestens fünf z.T. schwefelwasserstoffhaltige Quellen zusammenlaufen. Durch vertikale Risse im stark zerklüfteten Kalkgestein kann Grundwasser unterschiedlicher Herkunft an benachbarten Quellen austreten, wodurch Quellen mit und ohne Schwefelwasserstoffgehalt teilweise direkt nebeneinander zutage treten.<sup>188</sup> Das Vorhandensein von freiem H<sub>2</sub>S ist auf tertiäre Braunkohlelagerstätten<sup>178</sup> und den diese umgebenden Braunkohleton zurückzuführen, die reich an Pyrit (FeS<sub>2</sub>) sind<sup>184</sup> (Abb. 3). Es ist jedoch nicht endgültig geklärt, ob die Entstehung des freien H<sub>2</sub>S biogen oder anorganisch stattfindet. Eine chemische Entstehung von H<sub>2</sub>S wird



## Blockbild der Südlichen Frankenalb

In der Südhälfte Rekonstruktion des submarinen Reliefs zur Zeit des unteren Malm Zeta mit Aufteilung in Wannen- und Riffgebiete (höherer Malm Zeta und postjurassische Ablagerungen abgedeckt). Nördlich der Erosionsgrenze wird das durch Abtragung entstandene heutige Relief dargestellt.

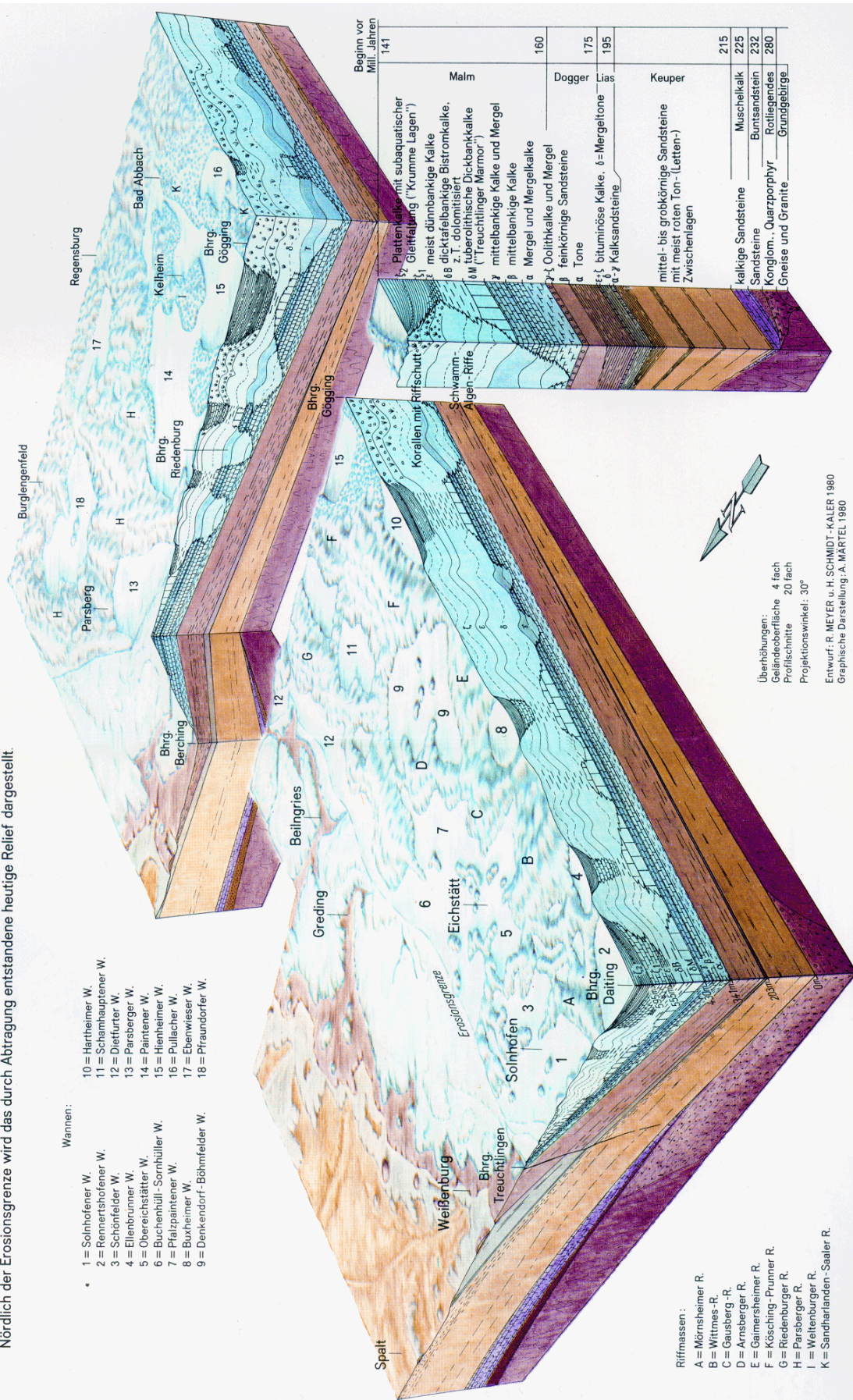
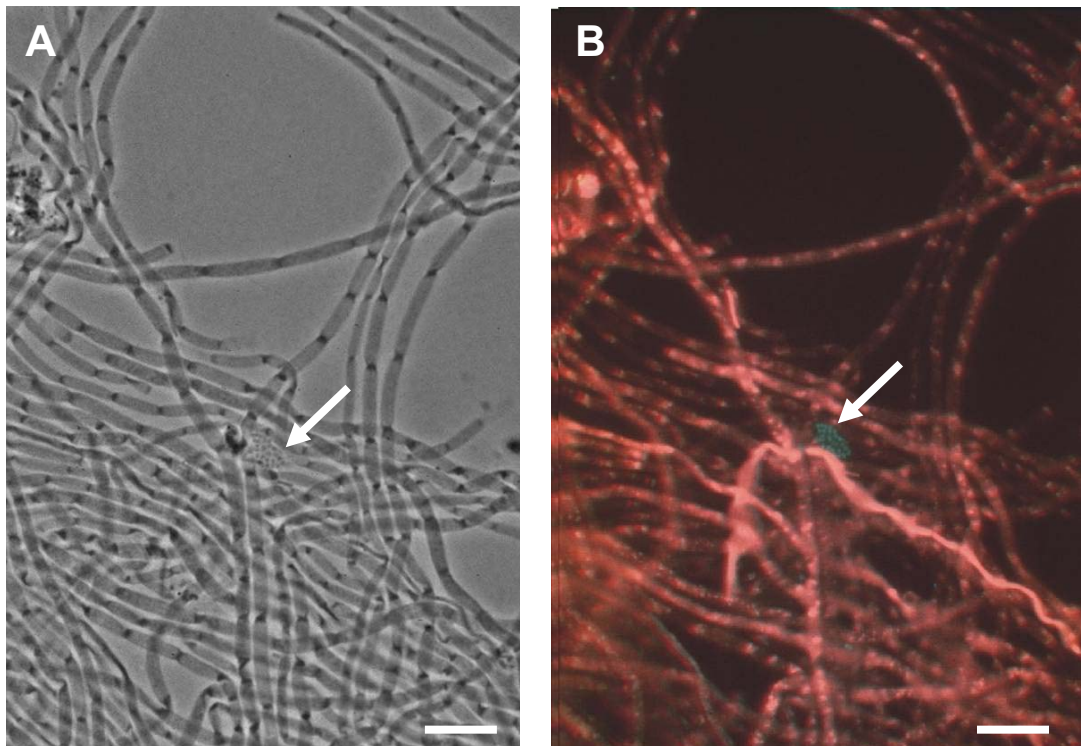


Abb. 3: Blockbild der südlichen Frankenalb (aus <sup>73</sup>).



über die Umsetzung von Pyrit mit frei gelöster Kohlensäure beschrieben<sup>11</sup>. Dieser Hypothese widersprechen Laborversuche, worin nicht einmal durch das Einwirken von heißer, halbkonzentrierter Schwefelsäure auf Pyrit Sulfid freigesetzt wurde<sup>17</sup>. Durch die Oxidation von Pyrit in oberflächennahen Bereichen ist allerdings die Entstehung von Sulfat möglich, das in tieferen, anaeroben Schichten bakteriell wieder zu  $\text{H}_2\text{S}$  reduziert werden kann<sup>124</sup>. Schwefelisotopenanalysen an österreichischen und deutschen Schwefelquellen, die alle negative  $^{34}\text{S}$ -Werte für Sulfidschwefel ergaben, sprechen ebenfalls für eine bakterielle Reduktion des Schwefels<sup>139</sup>. Übereinstimmende  $^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfid-Schwefels in den Quellen Bad Gögging verglichen mit dem Schwefel des dort vorkommenden Pyrit lässt ähnliche, biogene Entstehungsmechanismen annehmen<sup>17</sup>. Schwefelquellen treten demzufolge nur in Gesteinen zutage, die einen geringen Eisen- oder Schwermetallgehalt besitzen, so dass das Sulfid nicht vollständig ausfällt<sup>124</sup>. Weitere Isotopenanalysen an den gebohrten Schwefelquellen Bad Gögging ergaben  $^{14}\text{C}$ -Werte, die auf ein Grundwasseralter von 8000 Jahren bis zu 22000 Jahren schließen lassen, was das Eindringen von rezentem Oberflächenwasser ausschließt<sup>10</sup>.



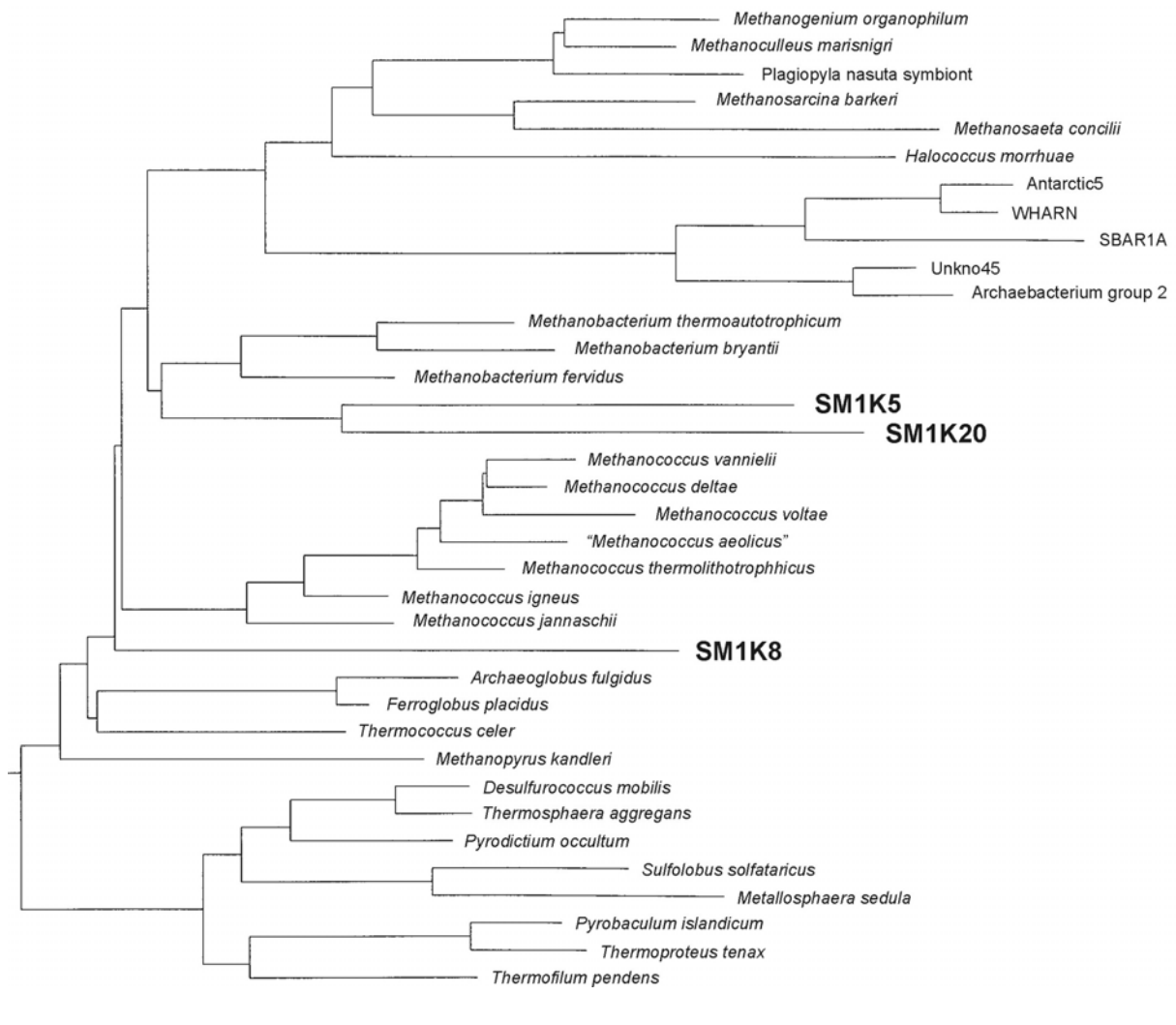
**Abb. 4:** FISH einer Minikolonie „hantelförmiger“ Archaeen in den weißen Filamenten des Sippenauer Moores (aus<sup>153</sup>). Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

A) Phasenkontrastaufnahme

B) Fluoreszenzaufnahme. Zweifach gefärbt mit Rhodamin Green<sup>TM</sup> gekoppelter archaeeller Sonde (ARCH915) und CY3-gefärbter bakterieller Sonde (EUB338). Archaeen sind grün gefärbt (Pfeil), Bakterien rot.

Die schwefelwasserstoffhaltigen Quellen im Sippenauer Moor werden bevorzugt am Boden, nahe dem Quellaustritt, mit einem weißen Belag von filamentösen Mikroorganismen bedeckt, die mit größter Wahrscheinlichkeit den aus der Quelle austretenden Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) oxidieren. Teilweise flutieren reinweiße, fädige Büschel („Streamer“) im Wasser, angeheftet an Steinen oder organischem Material. Wie Untersuchungen zeigten, werden diese Biofilme hauptsächlich aus Vertretern der Gattung *Thiothrix* aufgebaut<sup>118,153</sup>.

Neben den makroskopisch erkennbaren, filamentösen,  $H_2S$ -oxidierenden Bakterien werden Schwefelquellen noch von einer Vielzahl anderer Mikroorganismen besiedelt. Zu den Mitgliedern der auffälligen, weißen Biofilme zählen neben *Thiothrix* zahlreiche, weitere Vertreter der *Bacteria* oder auch der *Eukarya*, wie z.B. Rotatorien<sup>135</sup>. Vor kurzem konnten dort erstmals neuartige, kälteliebende *Archaea* mittels FISH nachgewiesen werden<sup>153,204</sup>.



**Abb. 5:** Phylogenetische Position der Archaeen, die in den weißen Filamenten der Schwefelquelle im Sippenauer Moor nachgewiesen wurden (Bezeichnung: SM1) (aus<sup>153</sup>). Maßstab: 10% Sequenzunterschied

Es handelt sich dabei sowohl um Vertreter der *Crenarchaeota* als auch um „hantelförmige“ *Euryarchaeota*, die in reinweißen Filamentbüscheln nahe dem Quellaustritt der Hauptquelle einzeln oder in Aggregaten aus bis zu ca. 100 Zellen mehrfach reproduzierbar nachgewiesen werden konnten (Abb. 4) <sup>153</sup>. In einer phylogenetischen Analyse des Standortes wurden drei unterschiedliche Sequenzklone innerhalb der *Euryarchaeota* erhalten. Der große phylogenetische Abstand dieser Sequenzen grenzt die entsprechenden Organismen von allen bisher bekannten mindestens auf Gattungsebene, wahrscheinlich jedoch auf Familienebene oder höher ab (Abb. 5) <sup>153</sup>. Diese „hantelförmigen“ Archaeen widerstanden, wie alle bisher identifizierten neuartigen Archaeen, einer Vielzahl von Kultivierungsversuchen <sup>153</sup>.

Die detaillierte Erforschung der „hantelförmigen“ Archaeen war als Ziel dieser Dissertation gesetzt. Hierbei sollte die Verteilung der neuartigen, unkultivierten „hantelförmigen“ Archaeen in Biofilmen der kalten Schwefelquellen im Sippenauer Moor untersucht werden. Das Ziel war es, Mikrohabitate mit einem erhöhten Anteil dieser Organismen ausfindig zu machen und anschließend die zugehörige 16S rRNA-Gensequenz der FISH-identifizierten, „hantelförmigen“ Organismen zu ermitteln. Um die ökologische Relevanz dieser Archaeen in kalten Schwefelquellen abzuschätzen, sollte die Verbreitung der „hantelförmigen“ Archaeen oder verwandter Organismen in Schwefelquellen der näheren und weiteren Umgebung untersucht werden. Rückschlüsse auf die Lebensbedingungen sollten durch die Bestimmung der physikalisch-chemischen Umweltparameter der Schwefelquellen als auch der Mikrohabitate gewonnen werden. In derartigen Mikrohabitaten entdeckte Zellmassen sollten die Grundlage für erste molekulare und biochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel dieser neuartigen Archaeen bilden. Hierbei sollten Schlüsselenzyme oder Stoffwechselmarker getestet werden, die einen Rückschluss auf einen Stoffwechselweg erlauben und bei den bisher bekannten Organismen dieses Stoffwechseltyps ubiquitär verbreitet sind. Die Untersuchungen dienen der Einschränkung denkbarer Stoffwechselwege dieser neuartigen, unkultivierten Archaeen und stellen eine weitere Grundlage für Kultivierungsversuche sowie für die Sequenzierung des ersten Gesamtgenoms eines unkultivierten Organismus aus der Umwelt dar.

## II. Material und Methoden

### 1. Bezugsquellen

#### 1.1. Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
25 bp-Leiter	Life Technologies, Gaithersburg (USA)
Agar Bacteriological (Agar No. 1)	Oxoid Ltd., Hampshire (UK)
Agarose	Appligene, Heidelberg
Agarose 1000	Life Technologies, Gaithersburg (USA)
Ampicillin, Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
AquaPhenol <sup>TM</sup>	Appligene-Oncor, Illkirch (Frankreich)
BacLight <sup>TM</sup>	Molecular Probes Inc., Leiden (Niederlande)
Brain Heart Infusion (BHI)	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calcein AM	Molecular Probes Inc., Leiden (Niederlande)
Citifluor AF-1	UKC, Chem. Lab., Canterbury (UK)
CTC (5-Cyano-2,3-ditoly1 Tetrazolium-chlorid)	Polysciences Inc., Warrington (USA)
DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMSO	Serva, Heidelberg
DNA-Längenstandard HindIII/EcoRI	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethanol	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Gase	Linde AG, Unterschleißheim
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glykogen	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid)	ICN, Biochemicals GmbH, Eschwege
Laktat (D,L) Na-Salz	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumhypochlorit-Lösung	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumtetrathionat	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumthiosulfat, wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer, Mannheim
PCR-Puffer für AmpliTaq (10x)	Perkin-Elmer, Roche, Branchburg (USA)
PCR-Puffer für GL-Taq (10x)	GL Bio Tech, Bremen
PCR-Enhancer	GL Bio Tech, Bremen
Pepton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Percoll Colloidal PVP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
pH-Maker	Appligene-Oncor, Illkirch (Frankreich)
PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pyruvat, Natriumsalz	Boehringer, Mannheim

REact 1 <sup>®</sup> (10x)	Life Technologies, Gaithersburg (USA)
Schwefel	Riedel de Haen, Hannover
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Boehringer, Mannheim
Sephadex G200-120	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Serdolit MB-1 (20-50 mesh)	Serva, Heidelberg
SYBR <sup>®</sup> Green I	Molecular Probes Inc., Leiden (Niederlande)
TAMRA	Molecular Probes Inc., Leiden (Niederlande)
Tris	USB, Cleveland (USA)
Trypton	Difco, Detroit (USA)
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galaktopyranosid)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Alle nicht in obiger Liste aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck KG (Darmstadt) bezogen.

## 1.2. Enzyme und Reaktionskits

Substanz	Bezugsquelle
AluI (10U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
AmpliTaQ DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	Perkin-Elmer Biosystems-Roche, Branchburg (USA)
GL-TaQ DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	GL Bio Tech, Bremen
HhaI (10U/ $\mu$ l)	Life Technologies, Gaithersburg (USA)
HinfI (10U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Microquant Hydrogensulfid-Test	Merck KG, Darmstadt
Qiaprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RsaI (10U/ $\mu$ l)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen BV, Groningen (Niederlande)

## 2. Puffer und Lösungen

### 2.1. DNA-Isolierung (Barns et al.,1994)

Alle Lösungen wurden unter Verwendung eigens angeschaffter Chemikalien mit hochreinem Wasser (LiChrosolv<sup>®</sup>) soweit möglich unter einer PCR-Sterilbank hergestellt. Spatel und Glasgeräte wurden vor Verwendung mit Chlorbleichlauge (5% Natriumhypochlorit-Lösung) gereinigt.

DNA-Isolierungs-Puffer A:	NaCl	100 mM
	Tris/HCl, pH 8,0	500 mM
	Na <sub>3</sub> Citrat	1 mM

DNA-Isolierungs-Puffer B:	NaCl	100 mM
	Tris/HCl, pH 8,0	200 mM
	SDS	4 %

Puffergesättigtes Phenol: Zur Neutralisation des sauren, wassergesättigten AquaPhenol<sup>TM</sup> wurden 5ml pH Maker<sup>TM</sup> Lösung (pH 7,5) mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 50 ml aufgefüllt und mit dem Phenol gut vermischt. Nach Trennung der beiden Phasen, wurde zur Kontrolle ein Aliquot der wässrigen Phase entnommen, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zweifach verdünnt und mit einem pH-Meter kontrolliert. Anschließend wurde mit Argon überschichtet und das AquaPhenol<sup>TM</sup> abgedunkelt bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2. DNA-Reinigung (Koch, 2001)

Phosphat-Puffer:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mM
------------------	--	-------

Nach der Herstellung einer jeweils 60 mM Lösung wurden diese bis zu einem pH-Wert von 7,4 gegeneinander titriert.

## Waschen von PVPP:

100 g PVPP wurden mit 1,3 Liter HCl (3 M) versetzt und bei Raumtemperatur (RT) 18 Std. gerührt. Nach dem Absaugen über einen Büchnertrichter mit Cellulose-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Nr. 595) wurde das PVPP in 1,5 Liter Phosphat-Puffer (60 mM; pH 7,4) resuspendiert und 2 Std. bei RT gerührt. Anschließend wurde das PVPP wieder filtriert, erneut in 1,5 Liter Phosphat-Puffer (60 mM; pH 7,4) resuspendiert und 30 min gerührt. Die Waschschritte mit Phosphatpuffer wurden drei- oder viermal wiederholt, bis die Suspension einen pH-Wert von 7,0 erreicht hatte. Nach einer letzten Filtration wurde das PVPP bei RT über Nacht getrocknet, autoklaviert und steril aufbewahrt.

## TE-Puffer

Tris/HCl, pH8,0	20 mM
-----------------	-------

EDTA, Dinatriumsalz	2 mM
---------------------	------

Die beiden Lösungen wurden in den angegebenen Konzentrationen mit hochreinem Wasser (LiChrosolv<sup>®</sup>) hergestellt und vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt.

### 2.3. Herstellung von Ethidiumbromidplatten

## EtBr-Agarose:

Agarose	5 g
1 M Tris/HCl, pH 7,5	5 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	1 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	0,25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 500 ml

Die Agarose wurde zunächst durch Kochen in Wasser gelöst, anschließend auf ca. 60°C abgekühlt und die restlichen Bestandteile zugegeben. Anschließend wurde die Lösung in Kunststoffpetrischalen gegossen (10 ml/ Petrischale), nach dem Erstarren in Alufolie gewickelt und vor Gebrauch mindestens 2 Tage bei 4°C gelagert. Abgedunkelt war die Lagerung der Platten bei 4°C über mehrere Monate möglich.



## 2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Gelelektrophorese

Nukleotid-Mix:	dATP (100 mM)	10 µl
	dCTP (100 mM)	10 µl
	dGTP (100 mM)	10 µl
	dTTP (100 mM)	10 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>bideest</sub>	360 µl
TAE-Puffer (40x): (zur Verwendung mit entionisiertem Wasser verdünnen)	Tris	40 mM
	Natriumacetat	20 mM
	EDTA (Säure)	2,5 mM
	mit Essigsäure (99,7 % (w/v)) auf pH 8,3 einstellen	
Auftragspuffer (10x):	Ficoll	25 % (w/v)
	Tris/HCl, pH 8,0	40 mM
	EDTA (Säure)	20 mM
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

## 2.5. Klonierung von PCR-Produkten

### 2.5.1 Klonierung

LB-Medium:	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
LB-Platten:	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bideest</sub>	ad 1000 ml

X-Gal-Lösung: (Lagerung bei -20°C)	X-Gal lösen in: Dimethylformamid	40 mg  1 ml
IPTG-Lösung: (Lagerung bei 4°C)	IPTG lösen in: H <sub>2</sub> O, hochrein (LiChrosolv <sup>®</sup> )	24 mg  1 ml

### 2.5.2 Restriktionsverdau

Enzympuffer REact 1 <sup>®</sup> (1x):	Tris/HCl, pH 8,0 MgCl <sub>2</sub>	50 mM 10 mM
Enzym-Mastermix:	AluI (10 U/μl) HhaI (10 U/μl) HinfI (10 U/μl) RsaI (10 U/μl) Puffer REact 1 <sup>®</sup> (10x)	0,25 μl 0,25 μl 0,25 μl 0,25 μl 1 μl

## 2.6. Ganzzellhybridisierung

Phosphat-Puffer:	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2 Nach dem Herstellen jeweils einer 0,2 M Lösung wurden diese bis zu einem pH-Wert von 7,2 gegeneinander titriert.	0,2 M
3x PBS-Puffer:	NaCl Phosphat-Puffer, pH 7,2	390 mM 30 mM

Fixierungslösung:	Paraformaldehyd	1,5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,3 ml
	NaOH, 5 M	15 µl
	3x PBS-Puffer	1,65 ml
	HCl, 2 M	15-20 µl

Das Paraformaldehyd wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> versetzt und nach Zugabe der NaOH unter Erwärmen auf ca. 70°C bis zum vollständigen Lösen depolymerisiert. Nach dem Abkühlen wurde der 3x PBS-Puffer zugegeben, mit HCl ein pH-Wert von ca. 7 eingestellt und die Lösung durch einen Cellulose-Filter (Schleicher & Schuell Nr. 595) filtriert. Diese Lösung konnte bei 8°C maximal 4 Tage gelagert werden.

Gelatine-Lösung:	Gelatine	0,1 % (w/v)
	KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	0,01 % (w/v)

Formamid (entionisiert):	Formamid	50 ml
	Serdolit MB-1 (20-50 mesh)	5 g

Das Formamid wurde nach Zugabe des Serdolits MB-1 bei Raumtemperatur 30 min gerührt und anschließend durch einen Cellulose-Filter (Schleicher & Schuell Nr. 595) filtriert. Nach dem Portionieren in Eppendorf-Cups (2 ml) konnten diese bei -20°C gelagert werden.

### Trägergebundene Hybridisierung:

Hybridisierungspuffer:	NaCl	0,9 M
	Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
	SDS	0,001-1 % (w/v)
	Formamid (entionisiert)	0 – 50 % (v/v)

Waschpuffer:	Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
	SDS	0,001-1 % (w/v)
	NaCl	0,18 M
Die SDS-Konzentration des Waschpuffers wurde an die des Hybridisierungspuffers angepasst.		

**Hybridisierung in Suspension:**

10x Standard Saline Citrat (SSC):	NaCl	0,15 M
	Na <sub>3</sub> -Citrat	1,5 M

Hybridisierungspuffer:	NaCl	0,9 M
	SSC	1x
	Tween 20 oder SDS	0,001%-1 % (v/v bzw. w/v)
	Formamid (entionisiert)	0 – 50 % (v/v)

Waschpuffer:	NaCl	0,9 M
	SSC	1x
	Tween 20 oder SDS	0,001%-1 % (v/v bzw. w/v)
Die Tween 20 bzw. SDS-Konzentration des Waschpuffers wurde an die des Hybridisierungspuffers angepasst.		

**Bakterieller Oligonukleotidmix (EUB338-Mix):**

Oligonukleotid EUB 338/I	50 ng
Oligonukleotid EUB 338/II	50 ng
Oligonukleotid EUB 338/III	50 ng
H <sub>2</sub> O, hochrein (LiChrosolv <sup>®</sup> )	1 µl

**DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindol)-Lösung:**

EDTA, Dinatriumsalz (100 mM)	50 µl
Na-Acetat (2 M), pH 4,7	30 µl
DAPI (1 mg/5 ml)	10 µl
Optional: SDS (10%)	10 µl

### 2.7. Bestimmung des Coenzym F<sub>420</sub>

TK-Stammlösung (20x):	KCl	1 M
	Tris/HCl, pH 7,5	1 M
Laufpuffer:	NaCl	0,3 M
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
Hochsalzpuffer:	NaCl	1 M
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM

### 2.8. Rasterelektronenmikroskopie

Cacodylat-Puffer:	Cacodylat, Na-Salz	75 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2mM
	Glutardialdehyd	2,5% (v/v)
	Der Puffer wurde mit HCl auf pH 7,0 eingestellt und anschließend das Glutardialdehyd zugegeben.	

### 2.9. CTC-Färbung

C <sub>org</sub> -Mix (1%):	Hefeextrakt	1,0 g
	Pepton	1,0 g
	Fleischextrakt	1,0 g
	Brain Heart Infusion (BHI)	1,0 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100ml

Braunkohleextrakt:	Braunkohleextrakt	10,0 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
Die Kohlesuspension wurde für 1 h aufgekocht und anschließend über einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell) filtriert. Zur Sterilisierung wurde der Extrakt autoklaviert (s. II.3.3).		

### 3. Organismen und Kulturbedingungen

#### 3.1. Organismen

Organismus	Medium	Gasphase	Inkubations- temperatur (°C)	Literatur (Medium)
<i>Aquifex pyrophilus</i> Kol5a	SME*	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> + 1% O <sub>2</sub>	85	Huber et al., 1992 <sup>85</sup>
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> VC16	MGG + 0,2% YE + 0,1% L(+)- Laktat	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	85	Huber et al., 1982 <sup>81</sup>
<i>Escherichia coli</i> K12	LB	aerob	37	Luria et al., 1960 <sup>107</sup>
<i>Ignicoccus islandicus</i> Kol8	½ SME + 1% S <sup>0</sup> + 0,02% YE	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	85	Blöchl et al., 1997 <sup>20</sup>
<i>Lactobacillus casei shirota</i>	MRS	aerob	32	DSMZ 11
<i>Methanococcus igneus</i>	MGG	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	85	Huber et al., 1982 <sup>81</sup>
<i>Methanococcus vaniellii</i> DSM1224	DSM 141	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	30	DSMZ 141
<i>Microvirgula</i> SG	TT	aerob	10	Konradt, 2001 <sup>95</sup>
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	BS +0,1% KNO <sub>3</sub> + 0,05% YE	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	100	DSMZ 611
<i>Pyrococcus furiosus</i> VC1	½ SME + 0,25% Pepton + 0,1% YE	N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	100	Blöchl et al., 1997 <sup>20</sup>
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Allen pH 2.0 + 0,02% YE	aerob	80	Brock et al., 1972 <sup>26</sup>
<i>Thermococcus celer</i>	½ SME + 1% S <sup>0</sup> + 0,5% YE	N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	85	Blöchl et al., 1997 <sup>20</sup>

### **3.2. Herstellung der Kulturmedien**

Aerobe Medien wurden nach dem Einwiegen und dem Einstellen des pH-Wertes zu je 20 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben (Borsilikatglas, Schott) abgefüllt und mit einer Alukappe verschlossen. Bei Zusatz von Schwefel wurde das Medium vor dem Abfüllen mit einem Ultra Turrax® (T25, Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert.

Bei der Herstellung anaerober Medien wurden die Bestandteile in einer 1 l Flasche (Borsilikatglas, Schott) unter aeroben Bedingungen eingewogen und gelöst. Nach dem Verschließen der Flasche mit einem Gummistopfen und der Sicherung durch einen durchbohrten Kunststoffdeckel (Schott GL 45) wurde das Medium für 20 min an der Gasstation mit N<sub>2</sub> durchgast. Nach dem Abfüllen des Mediums zu je 20 ml in 100 ml Serumflaschen (Natronkalk-Silikat-Glas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) im Anaerobenzelt (Coy, Michigan, USA; Gasmisch N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>: 95:5 (v/v)) wurden die Serumflaschen mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Serumflaschen wurden mit Aluminiumringen (Bellco Glass, New Jersey) gesichert, anschließend erfolgte dreimaliges Evakuieren und Begasen mit 300 kPa des gewünschten Gases. Genauso wurde mit der Herstellung von sterilen N<sub>2</sub>-Rollrändern verfahren.

### **3.3. Sterilisation**

Medien und Stammlösungen wurden in einem Autoklaven (SANOclav, Wolf, Geislingen) für 20 min bei 121°C und 200 kPa Druck sterilisiert; Spritzen, Glasgeräte und Gase wurden unter den gleichen Bedingungen 40 min autoklaviert. Schwefelhaltige Medien wurden eine Stunde bei 100°C bedampft. Organische oder hitzeempfindliche anorganische Substrate wurden mit einem Celluloseacetat-Filter (Porengröße: 0,22 µm; Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert.

## **4. Mikroskopie**

### **4.1. Phasenkontrastmikroskopie**

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Ansätze wurden mit einem Phasenkontrast-Mikroskop Standard 16 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit dem Objektiv F 100/1,25 Öl durchgeführt. Die Herstellung eines Perlen-Quetschpräparates erfolgte durch einen kurzen Druck auf das Deckgläschen, unter dem eine Perle auf einem Objektträger aufgebracht war.

#### 4.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mit einem Phasenkontrast-Mikroskop Standard 16 (Carl Zeiss, Oberkochen) in einer Zählkammer (Thoma; 0,02 mm x 0,0025 mm; Brand GmbH, Wertheim) bestimmt. Nach dem Auszählen der Zellen mehrerer Kleinstquadrate unter 500facher Vergrößerung (40x Objektiv; 12,5x Okular) wurde der Mittelwert gebildet und daraus die Gesamtzellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl/ml} = \text{Anzahl der Zellen pro Kleinstquadrat} \times 2 \times 10^7$$

#### 4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop Olympus BX 60 (Olympus Optical Co., Japan) mit UV-Ausstattung (UV-Netzgerät: U-RFL-T). Die Ausstattung mit spezifischen Filtersätzen für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff zeigt folgende Tabelle.

Farbstoff	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
BacLight™	BP 470 – 490	DM 500	BA 515
Calcein AM	BP 470 – 490	DM 500	BA 515
Coenzym F <sub>420</sub>	BP 420 – 440	DM 455	BA 475
CTC	BP 530 – 550	DM 570	BA 590
CY3	BP 530 – 550	DM 570	BA 590
DAPI	BP 360 - 370	DM 400	BA 420
Rhodamin Green™	BP 470 – 490	DM 500	BA 515
SYBR® Green I	BP 470 – 490	DM 500	BA 515
TAMRA	BP 530 – 550	DM 570	BA 590

Fluoreszenz-Filtersätze des Olympus BX 60 Phasenkontrastmikroskops.



Die Zellen wurden bei 1250-facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv (Plan 100/1,25) mikroskopiert. Bei der Hybridisierung mit zwei unterschiedlich markierten Oligonukleotiden wurde die Epifluoreszenz der beiden Farbstoffe sowohl mit der DAPI-Färbung als auch mit dem Phasenkontrastbild verglichen. Eine Aussage konnte nur getroffen werden, wenn nur eine der beiden Farbstoff-Markierungen eindeutig positiv war und zusätzlich sowohl im DAPI-Bild als auch im Phasenkontrastbild an dieser Stelle eine Zelle zu erkennen war.

#### **4.4. Elektronenmikroskopie**

##### **4.4.1. Probenvorbereitung**

Von einzelnen Perlen wurden Quetschpräparate (s. II.4.1) angefertigt und die Perle unter dem Phasenkontrast-Mikroskop Standard 16 (Carl Zeiss, Oberkochen) auf ihre typische organischemische Zusammensetzung hin überprüft. Anschließend wurde der Objektträger mit einer Pinzette in flüssigen N<sub>2</sub> gehalten und tiefgefroren. Nach Entnahme aus dem flüssigen N<sub>2</sub> wurde sofort das Deckglas durch Hebeln mit einer Rasierklinge abgesprengt und der Objektträger in Cacodylat-Puffer fixiert.

##### **4.4.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die weitere Präparation und die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden, wie in Huber et al., 1998<sup>84</sup> beschrieben, am Botanischen Institut der LMU München (Prof. Gerhard Wanner) durchgeführt.

### **5. Messungen und Probenentnahme**

#### **5.1. Messungen physikalischer und chemischer Parameter des Quellwassers**

##### **5.1.1. Temperatur**

Die Messung der Luft- und Wassertemperatur erfolgte jeweils direkt am Quellaustritt mit einem zu einem Stabthermometer umgebauten Digitalthermometer (GTH 1150; Greisinger electronic GmbH, Regenstauf).

### 5.1.2. pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mit einer pH-Einstabmesskette des Multifunktionsmessgerätes MultiLine P4 (WTW, Weilheim). Vor jeder Messung wurde die Sonde mit den beigegeführten pH-Standards kalibriert. Zur Messung wurde die pH-Sonde bis zum Erreichen eines konstanten Wertes in das sulfidische Quellwasser gehalten.

### 5.1.3. Sulfidgehalt

Der Sulfidgehalt der verschiedenen sulfidischen Quellen wurde mit dem Hydrogensulfidtest (Merck) ermittelt. Der Test beruht auf einer kolorimetrischen Abschätzung der durch Sulfid verursachten Methylenblau-Färbung. Der Test wurde durchgeführt wie in der Anleitung beschrieben und die Intensität der Blaufärbung der Wasserprobe nach einigen Minuten mit einer Farbpalette verglichen. Daraus konnte der Sulfidgehalt abgelesen werden.

### 5.1.4. Sauerstoff

Die Messung des gelösten Sauerstoffs im Quellwasser wurde mit dem Sauerstoffsensor CelloX 325 am Multifunktionsmessgerät MultiLine P4 (WTW, Weilheim) durchgeführt. Die Sonde wurde vor jeder Messung im Kalibrierungsgefäß geeicht. Die Messung des Sauerstoffgehaltes erfolgte in mg/l oder % Luftsättigung an einer repräsentativen Stelle bis zum Erreichen eines konstanten Wertes.

### 5.1.5. Leitfähigkeitsmessung

Die Bestimmung der Leitfähigkeitsmessung erfolgte direkt im Quellwasser mit der Sonde TetraCon<sup>®</sup> 325 des Multifunktionsmessgerätes MultiLine P4 (WTW, Weilheim). Zur Messung wurde die Sonde bis zum Erreichen eines konstanten Wertes in das sulfidische Quellwasser gehalten.

#### 5.1.6. Ionenzusammensetzung

Die Messung der Ionenzusammensetzung wurde von der Firma Dr. Blasy - Dr. Busse (Eching) durchgeführt. Die Probenahme erfolgte direkt vor Ort in vorbereitete Gefäße. Die blasenfrei entnommenen Proben für die Messung des Sauerstoffgehalts (braune 0,1 l Glasflasche, Schott) wurden mit je 2 ml der Winkler Fixierungslösungen I und II fixiert. In den Gefäßen zur Sulfidbestimmung war bereits Zinkacetat vorgelegt. Der Transport der Proben ins Labor erfolgte in einer Kühltasche bei einer Temperatur von 4 – 10°C.

### 5.2. Probenentnahme

Die Untersuchungen wurden an möglichst definierten Strukturen, wie z.B. Perlenketten, kugelartigen Verdickungen durchgeführt. Die mit Pinzetten entnommenen Proben wurden vor Ort in neue DNase/RNase-freie Reaktionsgefäße (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) überführt, in die Quellwasser vorgelegt wurde. Bei Proben für FISH wurde zusätzlich die entsprechende Menge Fixierungslösung direkt vor Ort zugegeben.

Gallertartige Strukturen wurden mit Hilfe von 1 ml-Spritzen von den jeweiligen Netzen abgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Für die Entnahme von Proben zur DNA-Isolierung wurden sterile und mit 5%iger Chlorbleichlauge behandelte Instrumente verwendet. Die entnommenen Proben wurden in DNase/RNase-freie Reaktionsgefäße (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) überführt.

Die Proben wurden in einer Kühltasche bei einer Temperatur von 4 – 10°C ins Labor transportiert und bei 4°C gelagert.

### 5.3. Dokumentation

Die Dokumentation der Schwefelquellen und der beprobten mikrobiellen Strukturen erfolgte entweder mit einer Spiegelreflexkamera (Olympus SC35) auf einem Farbdiaapositivfilm (Kodak Elitechrom 100) oder mit einer Digitalkamera (Coolpix 990, Nikon Corporation, Tokio, Japan). Die Dias wurden anschließend eingescannt (LS 1000, Nikon Corporation, Tokio, Japan).

## 6. Mikrosondenmessung in den Perlen

### 6.1. Messung der Sauerstoffkonzentration

Die eingesetzten Sauerstoff-Optoden (Precision Sensing GmbH, Neuburg a.d. Donau) besaßen einen Messbereich für Sauerstoff von 1% – 500% Luftsättigung. Die Messung erfolgte mit einem tragbaren Steuergerät Microx1 (Precision Sensing GmbH, Neuburg a.d. Donau), dessen Energieversorgung über eine Autobatterie sichergestellt wurde. Die Optoden ( $\varnothing$  ca. 20  $\mu$ m) wurden vor der Messung durch eine Zweipunktkalibrierung mit einer sauerstofffreien  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung bzw. einer sauerstoffhaltigen Lösung (21%  $\text{O}_2$ ) (Precision Sensing GmbH, Neuburg a.d. Donau) geeicht. Für die Messung wurde die Optodenspitze mit einem dreidimensional bewegbaren Mikromanipulator (Maerzhaeuser, Wetzlar), der an einem schweren Stativ befestigt war, an die gewünschte Stelle gebracht und bis zur Konstanz des Messwertes dort belassen. Die Messungen erfolgten ausnahmslos direkt im Biotop, um eine Sauerstoffdiffusion durch die Probenentnahme zu verhindern. Nachdem das Durchdringen der Hülle frei flotierender Perlen mit der Optodenspitze nicht möglich war, wurde die Sauerstoffkonzentration direkt an den Perlen gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden als maximale Sauerstoffkonzentration im Perleninneren interpretiert.

### 6.2. Messung des pH-Wertes

Zur Messung des pH-Wertes in einzelnen Kugeln der Perlenketten wurden pH-Optoden der Fa. Presens (Precision Sensing GmbH, Neuburg a.d. Donau) eingesetzt. Hierbei handelte es sich um neuentwickelte Prototypen, die im Vergleich zu den Sauerstoff-Optoden eine geringere Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes aufwiesen, wodurch die Verwendung mehrerer Optoden notwendig war. Nachdem bei gleichem pH-Wert jede Optode einen anderen Phasenwinkel besitzt, mussten sie vor Versuchsbeginn mit im Quellwasser temperierten pH-Eichlösungen (Precision Sensing GmbH, Neuburg a.d. Donau) kalibriert werden. Um Messungen im Biotop im Inneren einzelner Perlen durchführen zu können, mussten diese vorsichtig fixiert werden. Dazu wurde die Perlenkette in einer Rinne aus zwei V-förmig verklebten Objektträgern, die durch eine Laborhebebühne (Rotilabo<sup>®</sup>; Roth, Karlsruhe) direkt unter die Perlenkette gehoben wurden, im Biotop festgehalten. Daraufhin konnte die Optodenspitze mit Hilfe eines dreidimensionalen Mikromanipulators (Maerzhaeuser, Wetzlar), der an einem schweren Stativ befestigt war, in die Perle eingestochen werden (s. Abb. 22). Die

Messung erfolgte bis zur Konstanz der Messwerte. Zur Kontrolle wurde auch der pH-Wert des Wassers direkt an der Perle bestimmt.

In weiteren Messungen wurden die Perlen vorsichtig entnommen und der pH-Wert im Inneren sofort in einer mit Quellwasser gefüllten Petrischale bestimmt. Dazu wurde die Optodenspitze ebenfalls mit dem Mikromanipulator in die Perle eingeführt (s. Abb. 22).

## **7. Selektive Anreicherung der SM1-Archaeen aus der Umwelt**

Die selektive Anreicherung der SM1-Archaeen über Percoll-Gradienten wurde von C. Moissl ausgearbeitet (pers. Komm.).

### **7.1. Percoll-Gradienten**

Zur Herstellung der Dichtegradienten wurde Percoll mit sterilfiltriertem Quellwasser (0,22 µm; Pall Gelman Laboratory, Ann Harbor, USA) auf eine Endkonzentration von 12% (v/v) verdünnt und in Aliquots von 10 ml in 15 ml-Glaszentrifugenröhrchen (DuPont Instruments, Wilmington, USA) überführt. Nach einer Zentrifugation (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C) von 60 min bei 12.000 Upm konnten die stabilen Gradienten für einige Tage bei 8°C gelagert werden.

### **7.2. Aufwachsen der „Perlenketten“-Strukturen an künstlichen Oberflächen**

Die Perlenketten-Strukturen konnten im Biotop (Sippenauer Moor Probenahmestandort Str. 1) an künstlichen Polyethylen-Netzen (Conacord, Lippstadt) [0,5 cm Maschenbreite; ca. 10 m<sup>2</sup>] gezogen werden (C. Moissl, pers. Mitt.), die über ein Edelstahlgerüst im Biotop fixiert wurden. Dadurch konnte eine große Biomasse dieser Mikroorganismengemeinschaften erhalten werden.

### **7.3. Abschütteln der bewachsenen Netze**

Die bewachsenen Netze wurden in einen 2 l-Kunststoff-Messbecher überführt, der 0,5 l Quellwasser enthielt. Durch kräftiges Kneten und Auswringen mit der Hand (Latex-Handschuhe) wurde die aufgewachsene Biomasse abgelöst. Die Zellsuspension wurde in eine 1 l Duranglasflasche (Schott, Mainz) gefüllt und für ca. 16 h bei 8°C gelagert. Die

Zellsuspension vor der Lagerung stellt Fraktion A (Zellanteil SM1-Archaeen: bis zu 30%) der selektiven Anreicherung dar, der Überstand nach 16-stündiger Lagerung Fraktion B (Zellanteil SM1-Archaeen: bis zu 50%).

#### **7.4. Selektive Anreicherung der SM1-Archaeen mittels Percoll-Gradienten**

Der Überstand der sedimentierten Zellsuspension (Fraktion B; s. II.7.3) wurde auf Eis vorsichtig mit einer Schlauchpumpe (Ismatec® Labortechnik, Zürich, Schweiz) abgezogen und 15 min bei 18.000 Upm (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C) zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet in 0,5-1,0 ml sterilfiltriertem Quellwasser (0,22 µm; Pall Gelman Laboratory, Ann Harbor, USA) gut resuspendiert. Maximal 1 ml der Zellsuspension wurde vorsichtig auf einen 12%igen Percoll-Gradienten (s. II.7.1) aufgetragen und für 15 min bei 6.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient von oben in 500 µl Fraktionen portioniert und die mikrobielle Zusammensetzung mittels Phasenkontrastmikroskopie und FISH überprüft. In den oberen 2 cm des Gradienten konnten die SM1-Archaeen mit einem Zellanteil >95% nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um Fraktion C der selektiven Anreicherung.

#### **7.5. Entfernung des Percolls**

Das Percoll in den aufgereinigten Fraktionen könnte in Versuchen mit diesen SM1-Archaeen stören und musste deshalb entfernt werden. Dazu wurden ca. 5 ml der Percoll-gereinigten Fraktionen (s. II.7.4) mit ca. 30 ml sterilfiltriertem Quellwasser (0,22 µm; Pall Gelman Laboratory, Ann Harbor, USA) versetzt und 20 min bei 20.000 Upm zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig bis auf ein Restvolumen von ca. 5 ml abgezogen, erneut mit ca. 30 ml sterilem Quellwasser versetzt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in der gewünschten Menge sterilem Quellwasser aufgenommen.

Aufgrund des vorhandenen Percolls wurden die in einer Reinheit von 98% vorliegenden SM1-Archaeen über die erforderlichen Zentrifugationsschritte nur unzureichend sedimentiert. Im Gegensatz dazu sedimentierte ein Großteil der verunreinigenden Bakterien, was zu einer starken Verminderung der Reinheit der SM1-Zellen auf nur noch 60% Zellanteil führte.

### **7.6. Selektive Anreicherung der SM1-Archaeen ohne Percoll-Gradienten**

Der Überstand der sedimentierten Zellsuspension (s. II.7.3) wurde auf Eis vorsichtig mit einer Schlauchpumpe (Ismatec® Labortechnik, Zürich, Schweiz) abgezogen und 15 min bei 18.000 Upm (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C) zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet in 1 ml sterilfiltriertem Quellwasser (0,22 µm; Pall Gelman Laboratory, Ann Harbor, USA) gut resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe) überführt und 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 10°C). Der SM1-Archaeen enthaltende Überstand wurde mit einer Pipette bis auf ca. 50-100 µl vorsichtig abgezogen, das Zellpellet in 1 ml sterilfiltriertem Quellwasser gut resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und mit den anderen vereint. Die SM1-Archaeen sind darin in ähnlicher Reinheit enthalten wie in Fraktion C der Percoll-Reinigung (>95%).

### **7.7. Aufbereitung von SM1-Archaeen in gallertartige Strukturen**

Als Alternative zu den angereicherten SM1-Archaeen wurden in einigen Ansätzen gallertartige Ansammlungen von SM1-Archaeen verwendet, die erst kürzlich entdeckt wurden <sup>74</sup> und einen Reinheitsgrad von über 90% aufwiesen. SM1-Archaeen in diesen Strukturen wurden im Sippenauer Moor und am Islinger Mühlbach nachgewiesen. Sie wurden an Polyethylnetzen aufgefangen, die möglichst tief in der Quelle befestigt wurden, mit einer 1 ml Spritze abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Transport ins Labor erfolgte in einer Kühltasche bei 4-10°C. Durch eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm konnte die Reinheit im Überstand auf >95% SM1-Archaeen gesteigert werden.

## **8. Isolierung und Aufreinigung von Umwelt-DNA**

Alle für die DNA-Isolierung und DNA-Reinigung verwendeten Geräte wurden mit 5%iger Chlorbleichlauge gereinigt und mit entionisiertem Wasser gespült. Soweit möglich wurden die Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt, die ausschließlich für DNA-Arbeiten verwendet und mit Chlorbleichlauge gereinigt wurde.

### **8.1. DNA-Isolierung (Barns et al., 1994; modifiziert)**

Perlen oder Biofilme in Originalwasser wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß 20 min bei 20.000 Upm zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgezogen. Das Pellet wurde in 50 - 500 µl Puffer A resuspendiert und mit der gleichen Menge Puffer B versetzt. Zur besseren Lyse wurde der Ansatz bis zu dreimal im Kelvinator (Heraeus HFU 586 Top; Heraeus Instruments GmbH, Hanau) bei -80°C eingefroren und bei 56°C auf dem Heizblock (Eppendorf Thermostat 5320; Eppendorf, Hamburg) aufgetaut. Der Erfolg der Zell-Lyse wurde im Lichtmikroskop kontrolliert.

Um bei der DNA-Isolierung die organische Phase besser von der wässrigen trennen zu können, wurde das Phase Lock Gel light (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Das Gel wurde direkt vor dem Einsatz ca. 20 - 30 s bei 14.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 15°C) pelletiert. Auf das vorbereitete Gel wurde das Zell-Lysat gegeben und mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt. Nach vorsichtigem Mischen schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 Upm in der Kühlzentrifuge (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 15°C) an. Der über dem Gel liegende Überstand wurde mit 1 Vol. einer 1:1 Mischung von Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v/v) gemischt und erneut zentrifugiert (5 min; 14.000 Upm; 15°C). Anschließend wurde die wässrige Phase durch Zugabe von 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v/v) ausgeschüttelt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt und mindestens für eine Stunde, vorzugsweise über Nacht, bei Raumtemperatur gefällt. Alternativ erfolgte die Fällung der DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) pro 1 ml wässrige Phase bei -20°C für mindestens 2 Stunden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 20.000 Upm (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit 1 Vol. eiskaltem 70%igen Ethanol (v/v) gewaschen, nochmals 30 min zentrifugiert und anschließend im Exsikkator getrocknet. Die DNA wurde in 10 - 25 µl hochreinem Wasser (LiChrosolv®) vorsichtig gelöst.

### **8.2. DNA-Reinigung (Koch, 2001)**

Die Reinigung der aus Umweltproben isolierten DNA von PCR-hemmenden Begleitstoffen erfolgte über eigens hergestellte Säulen aus Sephadex G200-120 und PVPP. Dazu wurden 0,7 ml Sephadex G200-120 mit 20 mg PVPP (gewaschen; s. II.2.2) vermischt und nach Zugabe



von 2-3 ml TE-Puffer (pH 8,0) sofort gut verrührt. Nachdem dieser Vorgang 4-5 mal wiederholt wurde und alles Harz gut bedeckt war, erfolgte abgedeckt eine Äquilibration bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Suspension mit möglichst wenig TE-Puffer soweit verdünnt, so dass sie mit einer Pipette aufgezogen werden konnte. Je 500 µl wurden auf Nanosep<sup>™</sup> MF Microconcentratoren (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, USA) aufgetragen und 15 min bei 3.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 15°C) zentrifugiert. Der durchgetretene TE-Puffer wurde entfernt und der Vorgang solange wiederholt, bis die Microconcentratoren nach Zentrifugation bis knapp unter den oberen Rand mit Harz gefüllt waren. Die so gepackten Säulen konnten nun bei 4°C über längere Zeit gelagert werden.

Unmittelbar vor Verwendung der Säulchen wurden ca. 200 µl TE-Puffer auf das Harz aufgebracht und 15 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die in hochreinem Wasser (LiChrosolv<sup>®</sup>) gelöste DNA (maximal 100 µl Lösung bzw. 200 ng DNA) aufgetragen und erneut 15 min bei 3.000 Upm zentrifugiert. Die durchgetretene Flüssigkeit enthielt die gereinigte DNA, deren Konzentration auf der Ethidiumbromidplatte abgeschätzt werden konnte (s. II.8.3.1). Bei kleinen Mengen aufgetragener Flüssigkeit sollte ein zweiter Zentrifugationsschritt nach Zugabe von 10-15 µl TE-Puffer erfolgen.

### **8.3. Bestimmung der DNA-Konzentration**

#### **8.3.1. Ethidiumbromid-Agarplatten-Methode**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration von wässrigen Lösungen isolierter DNA erfolgte über den Vergleich mit Standard-DNA bekannter Konzentrationen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit DNA des Phagen  $\lambda$  angefertigt (3 ng/µl; 6 ng/µl; 12 ng/µl; 25 ng/µl; 50 ng/µl; 100 ng/µl) und je 1 µl der verschiedenen Standard-Konzentrationen auf eine Ethidiumbromidplatte aufgetragen. Nach dem Aufbringen von ebenfalls 1 µl der zu bestimmenden Lösung und 5 min Einwirkzeit konnte auf dem UV-Schirm ( $\lambda=312$  nm) durch Helligkeitsvergleich der Auftragspunkte die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

### 8.3.2. Photometrische Bestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde mit einem Spektralphotometer DU640 (Beckman Instruments, Fullerton; USA) in einer Quarz-Mikroküvette (100 µl Volumen) die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  bestimmt. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{OD}_{260} \times \text{spez. Konzentration}$$

Die spezifische Konzentration von DNA entspricht dabei 50 µg/ml. Aus dem Verhältnis  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  konnte die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Hierbei besaß reine DNA einen Faktor von 1,8.

## 9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 9.1. Standard-PCR

Alle PCR-Ansätze wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym, Hessisch Oldendorf) in einem Thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700, Perkin-Elmer Cetus, Norfolk, USA) durchgeführt. Die Ansätze wurden unter einer PCR-Sterilbank (Gelaire BSB4A; Flow Laboratories, Opera, Italien) mit kontaminationsfreien Pipettenspitzen (Gilson Inc., Middleton; USA) pipettiert.

Reaktionsansatz:

H <sub>2</sub> O (hochrein; LiChrosolv®)	18,8 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
Nukleotid-Mix (je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2,0 µl
F-Primer (25 ng/µl)	1,0 µl
R-Primer (25 ng/µl)	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (10 U/µl)	0,125 µl
DNA (10 ng/µl)	1,0 µl

Für jede Komponente des PCR-Ansatzes wurden entsprechende Positiv- und Negativ-Kontrollen durchgeführt. Als Kontroll-DNA diente bei der Amplifikation des archaeellen 16S rRNA-Gens *Thermococcus celer*-DNA, bei bakteriellen Ansätzen *Aquifex pyrophilus*-DNA. Bei archaeellen Amplifikationen aus Umwelt-DNA wurde zusätzlich ein Ansatz mit den Primern 9bF und 1406uR durchgeführt, um die Amplifikationsfähigkeit der eingesetzten DNA zu testen. Die untersuchten Proben enthielten deutlich mehr Bakterien als Archaeen, weshalb ein positives, bakterielles PCR-Produkt als Voraussetzung für eine nachweisbare PCR-Amplifikation der Archaeen diente.

Nachdem der Thermocycler eine Temperatur von 96°C erreicht hatte, wurden die Reaktionsgefäße in den vorgesehenen Block eingesetzt und nach dem folgenden Programm inkubiert:

Zyklenanzahl	Zeit	Temperatur
1	90 s	96°C
10	30 s	96°C
	30 s	60°C
	60 s	72°C
25	20 s	94°C
	30 s	60°C
	60 s (+2 s pro Zyklus)	72°C
1	10 min	72°C
1	∞	4°C

Zur Überprüfung der PCR wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Auftragspuffer (10x) versetzt und über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.9.8).

### 9.2. Primer

Primer	Position	Sequenz	Spezifität	Literatur
<b>8aF</b>	8 – 23	TCY GGT TGA TCC TGC C	Archaea	Burggraf et al., 1992 <sup>32</sup>
<b>9bF</b>	9 – 27	GRG TTT GAT CCT GGC TCA G	Bacteria	Burggraf et al., 1992 <sup>32</sup>
<b>109aF</b>	109 – 125	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Archaea	Großkopf et al., 1998 <sup>69</sup>
<b>345aF</b>	345 – 364	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	Archaea	Burggraf et al., 1997 <sup>30</sup>
<b>750aR</b>	767 – 750	TTC GBC CCT CAC CGT CGG	Archaea	Burggraf et al., 1997 <sup>30</sup>
<b>1119aR</b>	1101 – 1119	GGY RSG GGT CTC GCT CGT T	Archaea	Burggraf et al., 1997 <sup>30</sup>
<b>1406uR</b>	1406 – 1390	ACG GGC GGT GTG TRC AA	universell	Lane, 1991 <sup>99</sup>
<b>1512uR</b>	1492 - 1512	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT	universell	Lane, 1991 <sup>99</sup>
<b>M13F (-40)</b>	--	GTT TTC CCA GTC ACG A	Lac-Operon	--
<b>M13R</b>	--	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	Lac-Operon	--
<b>DSR1F</b>	--	ACS CAC TGG AAG CAC G	Sulfit-reduktase	Wagner et al., 1998 <sup>183</sup>
<b>DSR2F</b>	--	CTG GAA GGA YGA CAT CAA	Sulfit-reduktase	Wagner et al., 1998 <sup>183</sup>
<b>DSR3R</b>	--	GAA GAA SAT GWA CGG GTT	Sulfit-reduktase	Wagner et al., 1998 <sup>183</sup>
<b>DSR4R</b>	--	GTG TAG CAG TTA CCG CA	Sulfit-reduktase	Wagner et al., 1998 <sup>183</sup>

Alle PCR-Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

### 9.3. Reamplifikations-PCR

Eine Reamplifikations-PCR wurde angesetzt, wenn nach dem ersten PCR-Ansatz in Umweltproben noch kein PCR-Produkt erhalten werden konnte, das über die Gelelektrophorese nachweisbar war. In dieser nachfolgenden PCR wurde anstelle von DNA

ein Aliquot des ersten PCR-Ansatzes eingesetzt. Standardmäßig wurden 0,5 µl, 1,0 µl und 2,0 µl des ersten PCR-Ansatzes unter den gleichen Bedingungen erneut amplifiziert. Als Kontaminationskontrolle wurden gleiche Aliquots der Nullkontrolle des ersten Ansatzes eingesetzt. Die Reamplifikations-PCR wurde entsprechend dem ersten PCR-Ansatz durchgeführt.

#### 9.4. Ganzzell-PCR

Bei der Ganzzell-PCR wurden anstelle isolierter DNA ganze Zellen eingesetzt. Im Thermocycler führte der Hitzeschock bei der Hot-Start-PCR zur Lyse der eingesetzten Zellen und dem Freisetzen der DNA. Der PCR-Ansatz erfolgte wie bei der Standard-PCR beschrieben.

#### 9.5. PCR-Screening

Diese Methode wurde angewendet, um mit Hilfe der PCR die Insertgröße von verschiedenen Klonen zu überprüfen. Als Primer wurde hierbei das Primerpaar M13 lacZ (Forward[-40] und Reverse) verwendet, das an die flankierenden Bereiche der Multiple Cloning Site des Klonierungsvektors ansetzt. Die PCR erfolgte nach dem Protokoll der Standard-PCR (s. II.9.2), bei der plasmidhaltige Zellen als Template eingesetzt wurden. Die Größe der amplifizierten Inserts wurde durch Gelelektrophorese überprüft (s. II.9.8).

#### 9.6. Lightcycler-PCR

Die PCR-Anätze wurden mit einer Verdünnungsreihe aufgereinigter SM1-Archaeen (s. II.7.4) mit dem QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green PCR Mastermix (Qiagen, Hilden) im LightCycler (Roche, Mannheim) durchgeführt. Vorgeschaltete Ganzzellhybridisierungen der SM1-Zellen (Hybridisierung in Suspension; s. II.12.5.2) erfolgten mit modifizierten Sonden, die am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe gekoppelt waren, um eine Störung der PCR verhindern.

Reaktionsansatz (20 µl):

QuantiTect SYBR <sup>®</sup> Green PCR Mastermix (2x)	10 µl
QuantiTect RT-Mix	0,2 µl
F-Primer (25 ng/µl)	1,0 µl
R-Primer (25 ng/µl)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O (hochrein; LiChrosolv <sup>®</sup> )	5,8 µl
Zellen oder DNA (5 ng/µl)	2,0 µl

Der Ansatz wurde in die Kapillaren pipettiert und durch Zentrifugieren (LightCycler-Zentrifuge, Roche, Mannheim) evtl. vorhandene Luftblasen aus der Kapillare entfernt.

Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden für jede Komponente des PCR-Ansatzes gleichzeitig mit den Proben durchgeführt. Als Kontroll-DNA diente bei der Amplifikation des archaeellen 16S rRNA-Gens *Thermococcus celer*-DNA (*T.c.*-DNA). Im LightCycler wurden die Kapillaren nach folgendem Programm inkubiert:

50 Zyklen:	15 s	94°C
	20 s	60°C
	40 s	72°C

Die Zunahme des PCR-Produktes konnte durch Fluoreszenzmessungen (1x pro Zyklus) online verfolgt werden. Die Zyklenanzahl wurde auf 60 erhöht, wenn nach 45 Zyklen bei höheren Verdünnungsstufen noch kein PCR-Produkt erkennbar war. Zur Kontrolle des PCR-Produktes wurde nach der Amplifizierung noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Ansätze schrittweise auf 95°C geheizt und die Fluoreszenz gemessen. An der Schmelztemperatur des PCR-Produktes wurde durch das Aufschmelzen der DNA die gesamte Menge des an doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR<sup>®</sup> Green auf einmal freigesetzt, was zu einem plötzlichen Abfall der Fluoreszenz führte. PCR-Produkte einer Verdünnungsreihe sollten den gleichen Schmelzpunkt besitzen. Nach der PCR wurden die Ansätze zur Kontrolle noch über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt (s. II.9.8).

### 9.7. PCR der Sulfitreduktasegene

Die PCR-Ansätze zum Nachweis der Sulfitreduktasegene erfolgten wie bei der Standard-PCR beschrieben (s. II.9.2). Neben den verwendeten Primern unterschieden sie sich nur durch das verwendete Programm:

	15 s	94°C
30 Zyklen:	15 s	94°C
	20 s	54°C
	54 s	72°C

Der Nachweis der PCR-Produkte wurde wie in II.9.8 beschrieben durchgeführt.

### 9.8. Überprüfung des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese

Für die Analyse von PCR-Produkten wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde durch Kochen im TAE-Puffer (1x) gelöst, unter fließendem Wasser auf ca. 50°C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in eine horizontale

Gelkammer gegossen. Die Taschen des Gels wurden mit einer Mischung aus 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Auftragspuffer (10x) beladen. Als Standard wurden 3 µl des DNA-Längenstandards (HindIII/EcoRI verdaute Lambda-DNA) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 90 V für 20 – 45 min.

Bei mangelhafter Färbung konnte das Agarosegel anschließend für ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg Ethidiumbromid in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) nachgefärbt und danach kurz mit entionisiertem Wasser gewaschen werden. Die Auswertung erfolgte auf einem UV-Schirm bei  $\lambda=312$  nm und wurde mit dem EasyStore Imaging System (Herolab GmbH, Wiesloch) dokumentiert.

## 10. Klonierung

### 10.1. Reinigung des PCR-Produktes

Bei der Ultrafiltration wurden die PCR-Produkte auf den Microcon 100 – Filter (Amicon, Witten) überführt und zur Entfernung ungebundener Primer und Nukleotide mit 500 µl hochreinem Wasser (LiChrosolv<sup>®</sup>) versetzt, 5 min bei 7.000 Upm (Heraeus Picofuge MC-13) abzentrifugiert und das Waschwasser verworfen. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Waschvorgangs wurde 11 µl hochreines Wasser auf den Membranfilter pipettiert, nach zweiminütiger Einwirkzeit der Filter umgedreht und die gereinigten PCR-Produkte in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert (10 min, 7.000 Upm). Die Konzentration der PCR-Produkte wurde auf der Ethidiumbromidplatte abgeschätzt, wie unter II.8.3.1 beschrieben.

### 10.2. Durchführung einer Klonierung

Die Klonierung erfolgte mit dem Original TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) nach Anleitung des Herstellers.

Ligationsansatz:

PCR-Produkt (frisch, gereinigt)	1-2 µl
Ligationspuffer (10x)	1 µl
pCR <sup>®</sup> 2.1 Vektor (25 ng/µl)	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
Reinstwasser steril	ad 10 µl

Der Ligationsansatz wurde im 0,2 ml PCR-Cup angesetzt und über Nacht bei 10°C stehend inkubiert.

### 10.3. Screening der Klone nach verschiedenen Restriktionsgruppen

Weiße Kolonien, die das klonierte PCR-Fragment enthielten, wurden mit sterilen Zahnstochern von den LB-Platten abgenommen und einzeln in vorbereitete PCR-Ansätze getaucht (s. PCR-Screening, s. II.9.5). Anschließend werden zur Sicherung der Klone die Zahnstocher auf einem Segment einer LB-Platte mit Ampicillin (100 µl einer 10 mg/ml-Lösung) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Einteilung der Klone anhand des Inserts erfolgte mittels Restriktionsverdau (ARDRA = amplified rDNA restriction analysis <sup>181</sup>) mit einer Kombination von vier Restriktionsendonukleasen <sup>153</sup>. Zu den PCR-Screening-Ansätzen (je 15 µl) wurden je 2 µl des Enzym-Mastermixes (s. II.2.5.2) gegeben und die Ansätze mindestens für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Auftragspuffer (10x) (s. II.2.4) zugegeben und die Ansätze auf ein 3%iges (w/v) Agarose 1000-Gel mit Ethidiumbromid (30 µg/ 100 ml) aufgetragen. Als Längenstandard wurden 0,7 µg einer 25 bp-Leiter aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese für ca. 60 min bei 85 V. Anschließend wurde die Dokumentation wie in II.9.8 durchgeführt.

### 10.4. Sichern der Klone in Glycerinkulturen

Von jeder Restriktionsgruppe (s. II.10.3) wurde mindestens ein Klon auf 10 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (0,5 mg/10 ml) überimpft. Dazu wurde der Klon mit einer Impföse von der Sicherungsplatte in das LB-Medium übertragen und rotierend bei 37°C für 15 h inkubiert.

Zur Aufbewahrung der Transformanten wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde je Klon 2 ml Kultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in der TZ (Heraeus Picofuge MC-13; 13.000 Upm; 10 min; RT) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl frischem LB-Medium resuspendiert, mit 600 µl sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt. Die derart behandelten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

### 10.5. Isolierung von Plasmid-DNA

Aus den Flüssigkulturen der transformierten Zellen (s. II.10.4) wurde die Plasmid-DNA mit dem Qiaprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach den Herstellerangaben isoliert.



### 10.6. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde bei der Firma Entelechon GmbH (Regensburg) durchgeführt. Folgende Reaktionsansätze wurden hierfür in 0,2 ml PCR-Cups (Biozym, Hessisch Oldendorf) vorbereitet:

Sequenzansatz:

Plasmid-DNA	300 - 500 ng
Primer (25 ng/μl)	1 μl
H <sub>2</sub> O, hochrein (LiChrosolv <sup>®</sup> )	ad 15 μl

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden die Primer M13 lacZ (Forward [-40] und Reverse) ausgewählt. Bei klonierten Fragmenten mit einer Basenanzahl >800 wurden noch Sequenzansätze mit Primern durchgeführt, die innerhalb des Inserts liegen.

## 11. Sequenzdatenanalyse

Zur Analyse der 16S rRNA-Gensequenzen wurde ein Alignment von ca. 11.000 homologen Gesamt- und Teilsequenzen, die in öffentlichen Datenbanken zugänglich sind, verwendet (ARB Projekt <sup>105,106</sup>). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des ARB Software-Paketes in das bestehende Alignment eingepasst. Die Baumrekonstruktion erfolgte durch Distance-Matrix (Jukes und Cantor Korrektur <sup>87</sup>), Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood (fastDNAmI) Methoden unter Verwendung eines Termini-Filters sowie von Filtern für *Archaea*, *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota*. Für die Darstellung wurden repräsentative Sequenzen ausgewählt.

Die Analyse der Sulfitreduktase-Gene erfolgte mittels einer Blast-Suche in der Genbank-Datenbank über das Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Sequenzen wurden dabei mit allen hinterlegten Gensequenzen verglichen und die Gene mit der größten Homologie angezeigt.

## 12. Ganzzellhybridisierung mit Oligonukleotiden

### 12.1. Auswahl der Oligonukleotide und Fluoreszenzfarbstoffe

Alle verwendeten Oligonukleotide sind in folgender Tabelle aufgeführt. Die Positionsangaben der verschiedenen Oligonukleotide beziehen sich auf die 16S rRNA von *Escherichia coli* <sup>27</sup>. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind dabei komplementär zu den rRNA-Sequenzen, die für die jeweiligen Organismengruppen typisch sind.

Oligonukleotid	Position	Sequenz	Spezifität
EUB338/I (Amann et al., 1990 <sup>6</sup> )	355 – 338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Bacteria
EUB338/II (Daims et al., 1999 <sup>39</sup> )	355 – 338	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Bacteria
EUB338/III (Daims et al., 1999 <sup>39</sup> )	355 – 338	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Bacteria
ARCH345 (diese Arbeit)	345 - 364	TTC GCG CCT GST GCR CCC CG	Archaea
SMARCH402 (diese Arbeit)	402 - 434	CTC CAA ATG GAG GAA CTC	SM1- Archaeon
EURY498 (Burggraf et al., 1994 <sup>31</sup> )	510 – 498	GAA CGG GUC GGG AA	Eury- archaeota
SMARCH714 (diese Arbeit)	714 - 732	GCC TTC GCC CAG ATG GTC	SM1- Archaeon
ARCH750 (diese Arbeit)	750 – 767	TTC GYC CCT CAC CGT CGG	Archaea
ARCH915 (Stahl und Amann, 1991 <sup>164</sup> )	934 – 915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Archaea
ARCH1044 (diese Arbeit)	1044 - 1060	GGC CAT GCA CCW CCT CTC	Archaea
ARCH1101 (diese Arbeit)	1101 - 1119	GGY RSG GGT CTC GCT CGT T	Archaea

Alle Oligonukleotide wurden bereits farbstoffmarkiert von der Firma Metabion GmbH, Martinsried bezogen.

Bei den Hybridisierungen wurden in der Regel Doppelmarkierungen mit zwei unterschiedlich markierten Sonden verschiedener Spezifität (z.B. Archaea und Bacteria) durchgeführt, um die

positive Färbung einzelner Zellen abzusichern. In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Farbstoffe mit ihren Absorptions- und Emissionswellenlängen aufgeführt.

Farbstoff	Absorption	Emission
<b>CY3</b> (Indocarbocyanin)	552 nm	565 nm
<b>Rhodamin Green™</b> (Carboxyrhodamin 110)	502 nm	527 nm

### 12.2. Sondenkonstruktion

Zur Suche geeigneter Sondensequenzen wurden im ARB-Programm<sup>106</sup> 11.000 16S rRNA-Gensequenzen, die in öffentlichen Datenbanken zugänglich waren, miteinander verglichen und für die gewünschten Organismen spezifische Genabschnitte bestimmt. Bei der Sondauswahl wurde zum einen die Zugänglichkeit des jeweiligen Genabschnittes der 16S rRNA für Oligonukleotide anhand der bekannten Struktur aus *Escherichia coli* berücksichtigt<sup>62</sup>. Zum anderen wurden Sequenzabschnitte gewählt, die sich in möglichst vielen Basen zu allen anderen, bekannten 16S rRNA-Sequenzen unterschieden. Die Zugänglichkeit der 16S rRNA für diese Sonden wurde an den jeweiligen Mikroorganismen mit der organismenspezifischen SDS-Konzentration und verschiedenen Formamidkonzentrationen (0%, 10%, 20%, 30%, 40% und 50%) im Hybridisierungspuffer überprüft.

### 12.3. Beschichtung der Objektträger

Die mit einem Epoxidharz beschichteten Objektträger (6 Felder, 8 mm Durchmesser, Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim) wurden mit einer Detergenslösung gereinigt und nach gründlichem Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> getrocknet. Anschließend wurden sie durch Eintauchen in eine auf 70°C erwärmte Gelatine-Lösung beschichtet und an einem staubfreien Ort zum Trocknen aufgestellt<sup>7</sup>.

## 12.4. Fixierung der Zellen

Zur Zellfixierung wurden die Originalproben bzw. die Anreicherungskulturen sofort nach der Entnahme mit 1/10 Volumen frisch hergestellter Fixierungslösung (s. II.2.6) versetzt, gut durchmischt und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der TZ (Heraeus Picofuge MC-13) bei RT abzentrifugiert (13.000 Upm; 10 min, RT), das Zellsediment in 1 ml PBS-Puffer (1x) resuspendiert und erneut in der TZ abzentrifugiert. Durch diesen Waschschrift soll die restliche Fixierungslösung entfernt werden, die zu einer erhöhten Hintergrund-Fluoreszenz bei der Hybridisierung führt. Nach der Zentrifugation wurde für trägergebundene Hybridisierungen die gewünschte Zelldichte mit PBS-Puffer (1x) eingestellt (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml). Durch die Zugabe des gleichen Volumens Ethanol abs. konnten die Zellen über mehrere Wochen bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden. Bei Zellen für Hybridisierungen in Suspension wurde mit dem Zellpellet weitergearbeitet.

## 12.5. Durchführung einer Hybridisierung

### 12.5.1. Trägergebundene Hybridisierung

#### 12.5.1.1. Aufbringen der Zellen

Bei trägergebundenen Hybridisierungen wurden je nach Zelldichte 1–5  $\mu\text{l}$  der fixierten Zellen oder sehr kleine Stücke der Filamentproben auf einem Feld des Objektträgers oder der Laserkatapult-Folie vorsichtig verteilt, um die Gelatinebeschichtung nicht zu verletzen. Nach dem Trocknen der Zellen (15 min auf einem Heizblock oder im Heißluftschrank bei ca.  $50^\circ\text{C}$ ) erfolgte eine Dehydratisierung und Nachfixierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min in 50%, 80% und 96% Ethanol (v/v)). Abschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet.

### 12.5.1.2. Objektträger

Bei der Ganzzellhybridisierung<sup>7</sup> wurden für jede der verwendeten Oligonukleotid-Sonden die Hybridisierungsbedingungen eingestellt. Die Spezifität der Sondenbindung zwischen der RNA-Zielsequenz und dem Oligonukleotid wird neben dem Schmelzpunkt  $T_m$  der Sonde auch von äußeren Faktoren, wie Salzgehalt des Waschpuffers oder Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer beeinflusst. Alle Hybridisierungen wurden bei 46°C durchgeführt und die Formamidkonzentration jeder Sonde über eine Näherungsformel abgeschätzt<sup>102,154</sup>.

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,4 (\% \text{ G+C}) - 820/n - 0,5 (\% \text{ Formamid})$$

$T_m$  = Schmelztemperatur des Oligonukleotides (in °C)

M = Konzentration an monovalenten Kationen im Hybridisierungspuffer (in mol/l)

n = Basenanzahl des Oligonukleotides

Um die fixierten Zellen für die Sondenpenetranz durchlässig zu machen, wurde dem Hybridisierungspuffer SDS in einer auf den Organismus abgestimmten Konzentration zugesetzt.

Zur Durchführung der Hybridisierung wurden je 8 µl Hybridisierungspuffer auf die Felder der Objektträger gegeben und für 15 min im Hybridisierungssofen (OV 5, Biometra, Göttingen) bei 46°C im abgeschlossenen 50 ml Kunststoffröhrchen (Falcon Tubes™, Becton Dickinson, Irland) waagrecht vorinkubiert. Um eine Verdunstung zu vermeiden, wurde das Kunststoffröhrchen mit einem mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> getränkten Zellstofftuch ausgelegt. Nach der Vorinkubation wurden die Objektträger einzeln auf einen 37°C warmen Heizblock (Eppendorf) gelegt, möglichst zügig pro Feld je 1 µl der Sonden (50 ng/µl) aufgetragen, mit der Pipettenspitze vorsichtig verteilt und die Objektträger wieder im verschlossenen Kunststoffröhrchen bei 46°C für zwei Stunden waagrecht inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit ca. 3 ml 48°C-warmen Waschpuffer abgespült und danach für 15 min in 45 ml (50 ml Kunststoffröhrchen) des auf 48°C vorgewärmten Waschpuffers bei 48°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Objektträger kurz mit entionisiertem Wasser gespült und vorsichtig mit Druckluft trockengeblasen. Um ein rasches Ausbleichen der Sonden zu verhindern wurden die Objektträger möglichst dunkel gehalten und sofort in Citifluor AF-1-Lösung eingebettet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte kurz nach dem Einbetten; die Objektträger konnten bei sofortigem Einfrieren über mehrere Tage abgedunkelt bei -20°C aufgehoben werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop wie in II.4.3 beschrieben.

#### 12.5.1.3. Laserkatapult-Folie

Die Durchführung der Ganzzellhybridisierung erfolgte auf Objektträgern (0,17 mm Dicke), auf denen die jeweilige Folie am Rand mit Tesafilm oder farblosem Nagellack fixiert wurde. Die Vorbehandlung dieser Objektträger mit Gelatinelösung (s. II.2.6) erfolgte wie in II.12.3 beschrieben. Anschließend wurde der Bereich durch eine Umrandung mit dem PAP-PEN (Kisker, Mühlhausen) begrenzt, auf den die Probe aufgetragen wurde, um ein Zerfließen des Tropfens Hybridisierungspuffer zu vermeiden. Die folgende Hybridisierung wurde wie auf einem standardmäßig eingesetzten Hybridisierungsobjektträger durchgeführt (s. II.12.5.1.2).

#### 12.5.2. Hybridisierung in Suspension

Die fixierten Zellen wurden in Hybridisierungspuffer aufgenommen. 50 µl dieser Suspension wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit je 500 ng der gewünschten Sonden versetzt und abgedunkelt auf einem Heizblock (Dri-Block® DB-2D, Techne, Cambridge; GB) für 3,5 h bei 46°C inkubiert. Der Hybridisierungsansatz wurde anschließend mit 1 ml warmen Waschpuffer (46°C) verdünnt und weitere 15 min bei 46°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eiswasser gestoppt, die Zellen 15 min bei 14.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 4°C) zentrifugiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde in 20 µl Waschpuffer aufgenommen und konnte über Nacht bei 4°C gelagert werden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde wie in II.4.3 beschrieben durchgeführt.

#### 12.6. Färbung der hybridisierten Zellen mit DAPI

Die Felder der Objektträger wurden nach dem Waschen für 2-3 Minuten mit je 10 µl einer 1:10 mit Waschpuffer verdünnten DAPI-Lösung überschichtet. Der Farbstoff färbt dann alle Zellen an und eignet sich zur Unterscheidung von Mikroorganismen und Schmutzpartikeln bei einem positiven Hybridisierungsergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop (s. II.4.3).

### 13. Laserkatapult

Die Versuche zur Zellvereinzelung hybridisierter Zellen wurden mit einem Laserkatapult (Palm, Bernried) durchgeführt, das aus einer Lasereinheit und einem inversen Phasenkontrastmikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Fluoreszenzausstattung

bestand. Dabei wurden sowohl die standardmäßig eingesetzte Trägerfolie auf ihre Fluoreszenzeignung getestet als auch Schnittversuche mit dem integrierten UV-Laser (260 nm) an verschiedenen Folien anderer Zusammensetzung durchgeführt. Die Folien wurden entweder mit farblosem Nagellack oder mit Tesafilm auf einem dünnen Objektträger (Dicke 0,17 mm) fixiert und anschließend die Proben aufgebracht. Die Mikroskopie hybridisierter Zellen erfolgte wie unter II.4.3 beschrieben.

## **14. Bestimmung der Lebensfähigkeit**

### **14.1. BacLight™-Färbung**

Eine Perle aus dem Sippenauer Moor wurde in ca. 100 µl sterilfiltriertem Quellwasser aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 µl LIVE/DEAD® BacLight™ (Komponente A+B) wurde der Ansatz für 5 min abgedunkelt auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Quetschpräparat der Perle angefertigt (s. II.4.1), das unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde (s. II.4.3).

### **14.2. Bestimmung mit Zellsorter**

Frisch angereicherte SM1-Archaeen (Anreicherung ohne Percoll; s. II.7.6) wurden in Aliquots von 500 µl in Reaktionsgefäße aufgeteilt. Jedes Aliquot wurde mit einem Farbstoff (1 µl; s. Tab.) versetzt, die Zellsuspension vorsichtig gemischt und auf Eis abgedunkelt für 10 min inkubiert. Der ungebundene Farbstoff wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 20.000 Upm (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor, 4°C) und anschließendes gutes Resuspendieren in 500 µl sterilfiltriertem Quellwasser entfernt. Die Färbung der Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Anschließend erfolgte die Messung gefärbter Zellen am Zellsorter MoFlo (Cytomation, Fort Collins, Colorado, USA), der mit zwei Lasern (488 nm; 354 nm) ausgestattet war. Vor Versuchsbeginn wurde das Gerät kalibriert, d.h. der 488 nm-Laser mit Hilfe von 10 µm großen, fluoreszierenden calibration-beads (Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim) fokussiert. Der Übergang des kontinuierlichen Probenstrahls (Hüllflüssigkeit: 48 g/l NaCl) in 1 nl-Tröpfchen mit jeweils einem umhüllten Partikel wurde durch elektronische Justierung der am Strahl anliegenden Frequenz (ca. 100 kHz) und Amplitude (10-15V) eingestellt. Der letzte anhaftende Tropfen bekam eine Ladung von

+190V und wurde durch Ablenkplatten mit einer anliegenden Spannung von 3000V in ein Auffanggefäß gelenkt.

Beim Auftreffen des Laserstrahls auf ein fluoreszierendes Partikel im Probenstrahl entsteht Streulicht, welches nach vorne und seitlich abgelenkt und von Detektoren registriert wird. Bestimmte Wellenlängenbereiche des fluoreszierten Streulichts wurden, abhängig vom eingesetzten Farbstoff (s. Tab. unten), durch geeignete Filter vor den Detektoren blockiert bzw. durchgelassen. Die Kontrolle der korrekten Funktion des Zellsorters erfolgte durch mehrfach reproduzierte Sortierung einer festgelegten Anzahl von fluoreszierenden calibration-beads auf einen Objektträger und Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nach der Kalibrierung wurden die gefärbten Zellsuspensionen über den Zellsorter aufgetrennt. Mit diesem Gerät war es möglich bis zu 70.000 dieser Ereignisse pro Sekunde zu messen.

Farbstoff	Emission	Färbung der Zellen	Ziel
TAMRA	565 nm	alle	Proteine
SYBR <sup>®</sup> Green I	530 nm	alle	DNA
LIVE/DEAD <sup>®</sup> BacLight <sup>™</sup> Komponente A	530 nm	lebende	DNA
Calcein AM	530 nm	lebende	Esterasen

Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Wirkorte

## 15. Methanmessung am Gaschromatographen (GC)

### 15.1. Probennahme

Ein 5 ml Rollrandgefäß (Macherey & Nagel, Düren) wurde im Sippenauer Moor mit Wasser des Probenahmestandortes Str. 1 gefüllt. Anschließend wurden mit der Pinzette vorsichtig unter Wasser je zwei große, gasgefüllte Perlen in das Rollrand überführt. Nach der Entnahme von 2,5 ml Wasser wurden die Rollränder vorsichtig mit einem Gummistopfen verschlossen und mit Aluminiumringen (Bellco Glass) gesichert. Das anschließende starke Schütteln ließ die Perlen platzen und setzte das beinhaltete Gas in den verbliebenen 1,5 ml Gasphase frei. Die Gasphase des Rollrandgefäßes wurde zur GC-Messung verwendet.



### 15.2. GC-Messung

Vor der Methanmessung musste der Gaschromatograph (Hewlett-Packard 5890) für mindestens zwei Stunden bis zum Erreichen der stabilen Messtemperatur vorgeheizt werden. Die Entnahme einer Gasprobe aus den verschlossenen Rollrandgefäßen erfolgte mit einer 1 ml-Spritze und einer dünnen Kanüle. Die Spritze wurde durch ein Aufziehen von 0,2 ml Gasphase gespült und anschließend wurden 0,1 ml der Gasprobe über ein Septum in den Gaschromatographen (Injektortemperatur: 170°C) injiziert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Temperatur von 140°C mit Hilfe eines Trägergases (Helium; Flow: 14,6 ml/min) über ein Molekularsieb 5A 60/80 (Edelstahlsäule 2 mm x 2 m; Restek Corporation). Die anschließende Detektion erfolgte über einen FID-Detektor (Temperatur: 220°C). Die Verweildauer des Methans auf der Säule bis zur Detektion schwankte zwischen 64 und 67 Sekunden. Die Methanmenge wurde anhand des Integrals des Methanpeaks festgestellt, das der Integrator (Agilent 3395) anzeigte.

Vergleichende Messungen mit dem Gaschromatographen wurden mit einem Methanstandard (1:1440-Verdünnung in N<sub>2</sub>) durchgeführt. Veränderungen durch das Original-Wasser wurden ausgeschlossen, indem eine Kontrolle ohne Perlen wie die Proben behandelt wurde. Im Labor wurde dann der Gasphase noch 0,1 ml Methan zugesetzt. Die Spezifität der GC-Säule wurde durch die Messung von Methanol überprüft, das aus der Gasphase einer Methanolfflasche erhalten wurde.

## 16. Bestimmung des Coenzym F<sub>420</sub>

### 16.1. Herstellung der Chromatographiesäulen

Zum Aufquellen der DEAE-Cellulose DE 52 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) war ein sog. Precycling nötig. Dazu wurde die Cellulose in 15 Vol. 0,5 M NaOH eingerührt und für ca. 30 min inkubiert. Nachdem die NaOH über einen Büchnertrichter mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde, erfolgte ein Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bis die abgezogene Flüssigkeit pH 7,0 aufwies. Die so vorbereitete Cellulose wurde in 5 Vol. TK-Stammlösung mit 20% Glycerin aufgenommen und konnte einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Zur Entfernung der Cellulose-Bruchstücke („Fines“) wurde die DEAE-Cellulose vor Gebrauch im TK-Puffer mit Glycerin aufgerührt, die für eine Säule benötigte Menge in einen

Messzylinder überführt und über einen bestimmten Zeitraum sedimentiert. Die Sedimentationszeit ( $t$ ) errechnete sich aus der Füllhöhe des Messzylinders ( $h$ ) und einem Cellulose-spezifischen Faktor ( $n$ ; bei DE 52:  $n=2,4$ ) nach folgender Formel:  $t = n \times h$ . Nach dieser Zeit wurde der Überstand abdekantiert, das verbleibende Volumen Cellulose in 2 Volumen TK-Puffer aufgeschlämmt und vorsichtig an einem Glasstab auf eine FPLC-Säule ( $\varnothing$  1 cm) aufgebracht. Das restliche Säulenvolumen wurde mit TK-Puffer aufgefüllt und die Cellulose in der Säule über mehrere Stunden sedimentiert. Im optimalen Fall entsprach die Füllhöhe der Cellulose in der Säule dann ca. 5-6 cm. Nach dem Ablassen des TK-Puffers wurde die Cellulose mit mindestens dem doppelten Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Säulenmaterial nie trocken lief und beim Aufbringen des Puffers die Cellulose nicht aufgewirbelt wurde.

### **16.2. Probenaufarbeitung**

Die gefrorenen Zellmassen der Kontrollorganismen bzw. frische Zellen aus den Schwefelquellen wurden in  $H_2O_{bidest}$  (ca. 5 ml/g Zellmasse) resuspendiert, mit der gleichen Menge eiskalten Acetons ( $-20^{\circ}C$ ) vermischt und ca. 30 min bei  $4^{\circ}C$  gerührt. Anschließend wurde die Suspension bei 15.000 Upm für 30 min zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge RC5C Plus, SS34 Rotor,  $4^{\circ}C$ ). Das Pellet wurde in 50% eiskaltem Aceton ( $-20^{\circ}C$ ; 5 ml/g Zellmasse) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die beiden Acetonüberstände wurden vereinigt und für die Bestimmung des Coenzym  $F_{420}$  verwendet (s. II.16.3).

### **16.3. Nachweis des Coenzym $F_{420}$**

Die vereinigten Acetonüberstände (s. II.16.2) wurden mit doppeltem Volumen Laufpuffer verdünnt und vorsichtig auf die äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit dem zweifachen Volumen Laufpuffer gewaschen. Die Extraktion des Coenzym  $F_{420}$  aus der Säule erfolgte mit dem dreifachen Volumen Hochsalzpuffer. Um das eluierte Coenzym  $F_{420}$  nicht zu sehr zu verdünnen, wurden kleine Fraktionen (500  $\mu$ l) direkt in Kunststoffküvetten aufgefangen und anschließend photometrisch (Beckman DU 64; Beckman Instruments, Fullerton; USA) vermessen. Die Extinktion bei 420 nm korrelierte direkt mit dem Gehalt an  $F_{420}$ .

## 17. CTC-Färbung

### 17.1. Kontrollen

Bei aeroben Ansätzen wurde jeweils 1 ml der bewachsenen Kultur der Kontrollorganismen entnommen, in einem Reaktionsgefäß 10 min bei 13.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 10°C) abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml frischem Medium aufgenommen. Wurde ein unterschiedliches Medium oder ein Puffer verwendet, erfolgte mit diesem ein weiterer Waschschrift. Die Zellen wurden mit 25 µl CTC versetzt und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

Bei anaeroben Ansätzen wurde 1 ml der Kultur mit einer 1 ml Einweg-Spritze entnommen und direkt in ein steriles 5 ml Rollrandgefäß mit der jeweiligen Gasphase überführt. Die Herstellung dieser anaeroben Rollrandgefäße erfolgte wie unter II.3.2 für anaerobe Medien beschrieben. Anschließend wurden 25 µl CTC zugegeben und der Ansatz bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

Alle Ansätze wurden in Parallelen und mit Medienkontrollen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop wie in II.4.3 beschrieben.

### 17.2. Probennahme

Die Probennahme erfolgte weitgehend unter Sauerstoffausschluss. Dazu wurden gallertartige Strukturen der SM1-Archaeen (SM1-Anteil ca. 90 – 95%) von Netzen aus dem Islinger Mühlbach direkt im austretenden Schwefelwasser entnommen. Die Gallerten wurden unter Wasser von den Netzen mit Glasspritzen (Fortuna® Optima, Poulten & Graf GmbH, Wertheim), die zuvor im Quellwasser gespült wurden, entnommen. Anschließend wurde ebenfalls unter Wasser eine Einmalkanüle (Henke Sass Wolf, Tuttlingen) aufgesetzt und die Probe in ein steriles 5 ml Rollrandgefäß (Macherey & Nagel, Düren) überführt, das eine N<sub>2</sub>-Atmosphäre enthielt. Die Herstellung dieser anaeroben Rollrandgefäße erfolgte wie unter II.3.3.2 für anaerobe Medien beschrieben. Die Proben wurden beim anschließenden Transport und der weiteren Verarbeitung gekühlt (ca. 8°C).

### 17.3. Ansätze

Die folgenden Arbeiten wurden in einer Anaerobenkammer (Coy, Michigan, USA; Gasgemisch N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>: 95:5 (v/v)) durchgeführt. Die Proben und Ansätze wurden dabei mit einem Thermostaten (ThermoStat Plus, Eppendorf, Hamburg) gekühlt, auf dessen Kühlfläche eine Halterung aus Aluminium, passend für die 5 ml Rollrandgefäße, befestigt wurde.

In der Anaerobenkammer wurden die Proben geöffnet und zur besseren Auswertung eine homogene Mischung der Zellen aller Probengefäße hergestellt. Mit den einzelnen Substraten (Endkonzentration 0,01%) wurden in der Anaerobenkammer Parallelansätze in 5 ml Rollrandgefäßen nach folgendem Schema vorbereitet:

Quellwasser (Islinger Mühlbach; sterilfiltriert)	1 ml
Substrat (1%)	10 µl
CTC (5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazoliumchlorid)	25 µl
SM1-Zellsuspension	100 µl

Bei Ansätzen mit organischem Zusatz wurde zusätzlich 10 µl C<sub>org</sub> (0,5%) zugesetzt. Das Verschließen der Rollränder, sowie das Aufpressen einer definierten Gasphase erfolgte wie in II.3.2 beschrieben. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 10°C.

Zur besseren Auswertung wurde an die Färbung noch eine FISH mit dem Sondengemisch ARCH-Mix angeschlossen, das mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin Green<sup>TM</sup> markiert war. Die Fixierung der Zellen und die Durchführung der Hybridisierung erfolgte auf einem Objektträger wie in II.12.5.1.2 beschrieben. Wegen der Alkohollöslichkeit des kristallinen, reduzierten CTC wurde auf eine Dehydratisierung durch die aufsteigende Ethanolreihe nach dem Auftragen der Zellen verzichtet.

## **18. GC-Gehalt**

Für die Bestimmung des GC-Gehaltes wurden SM1-Archaeen aus dem Sippenauer Moor ohne Percoll-Gradienten aufgereinigt (s. II.7.6) und in 50% Isopropanol bei -20°C aufbewahrt. Die hochreinen Fraktionen aus verschiedenen Aufreinigungen wurden bis zu einer Gesamtzellzahl von  $1 \times 10^{10}$  Zellen vereinigt. Außerdem wurden 2 ml gallertartige Ansammlungen der SM1-Archaeen aus dem Islinger Mühlbach über eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm (Eppendorf-Kühlzentrifuge 5810R, F45-30-11 Rotor; 10°C) auf eine Reinheit von über 95% gereinigt und ebenfalls in 50% Isopropanol bei -20°C gelagert. Die DNA-Extraktion erfolgte bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) nach einer speziellen Methode im Mikromaßstab. Anschließend wurde der GC-Gehalt über HPLC bestimmt.

## **19. Lipidbestimmung**

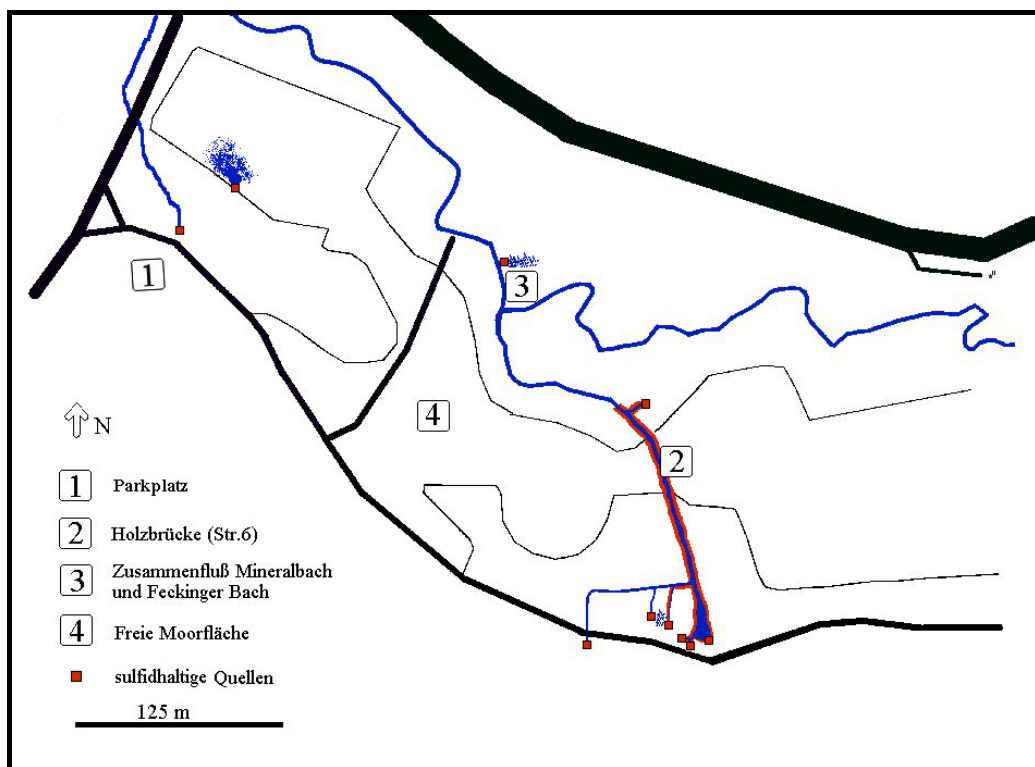
Die Lipidbestimmung erfolgte vergleichend an den Fraktionen A, B und C der selektiven Anreicherung ohne Percoll-Gradienten (s. II.7.6). Dazu wurden Zellen aus verschiedenen Probenahmen gesammelt, ein Aliquot mittels FISH (s. II.12.5.1) auf die Konzentration der SM1-Zellen überprüft, der Rest bei -20°C aufbewahrt und vor dem Versand gefriergetrocknet (Lyophylle Beta 1-16, Christ Apparatebau, Osterode). Die Lipidextraktion und -analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte durch Prof. Roger Summons am Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge (USA).

### III. Ergebnisse

#### 1. Untersuchungen zur Verteilung der Archaeen im Sippenauer Moor

##### 1.1. Beschreibung der Probenahmeorte

Die neuartigen, „hantelförmigen“ Archaeen konnten im Bereich des Probenahmeortes Str. 1 (Abb. 28A) nachgewiesen werden<sup>153</sup>. Mit dem Austritt der Hauptquelle am Str. 1 entsteht ein Bach, dessen Lauf häufig von reinweißen Belägen ausgekleidet war, die sich über organisches Material (Blätter, Äste, Holz) und Steine zogen. In einigen Bereichen waren noch weitere, verschieden gefärbte Beläge erkennbar. Auffällig waren an Steinen oder Ästen angeheftete, reinweiße Filamentbüschel („Streamer“), die frei im Wasser flotierten und deren Länge von 0,5 bis 30 cm reichte. In diesen Filamentbüscheln und den unterschiedlich gefärbten Biomatten wurde die Verteilung der Archaeen durch FISH-Analysen untersucht. Außerdem wurden auffällige Beläge und mikrobiellen Strukturen benachbarter, sulfidhaltiger Quellaustritte, sowie des gesamten Mineralbachs bis ca. 100 m nach dem großen Quelltopf analysiert. Der Bereich der Probenahmen ist in Abb. 6 rot dargestellt. Während des Bearbeitungszeitraumes zeigten die Probenahmeorte starke Unterschiede in der Biomasseproduktion, was sich im schwankenden Ausmaß der charakteristischen Beläge widerspiegelte.



**Abb. 6:** Detailkarte des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor (Skizze nach Warneke, 1992<sup>186</sup>). Die Probeentnahmestellen sind rot gekennzeichnet.

## 1.2. Entwicklung eines archaeellen Sondengemisches

Die Untersuchungen zur Verteilung der „hantelförmigen“ Archaeen wurden durch FISH mit der universellen, archaeellen Sonde ARCH915 durchgeführt. Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin Green™, um Hintergrundsignale bei geringem Archaeengehalt in der Umweltprobe zu minimieren, wie sie durch den roten Farbstoff CY3 entstanden. Nachteilig ist allerdings die mangelnde Brillanz des Farbstoffes, wodurch gefärbte Zellen teilweise nur schwer mit dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar waren. Dieses Problem wurde durch die Konstruktion neuer, universeller Sonden umgangen, die kombiniert in Mehrfachmarkierungen eingesetzt wurden (Tab. 1). Als Grundlage dienten bereits bekannte Primer-Sequenzen, die bisher für die PCR-Amplifikation von Archaeen verwendet wurden. Eine Überprüfung der Spezifität bzw. Universalität innerhalb der Archaeen erfolgte mit dem ARB-Programm<sup>106</sup> an ca. 11.000 Gesamt- und Teilsequenzen, die in öffentlichen Datenbanken zugänglich waren.

Sonden-bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Position*	Primer-sequenz
ARCH345	TTC GCG CCT GST GCR CCC CG	345 - 364	Burggraf et al., 1997 <sup>30</sup>
ARCH750	TTC GYC CCT CAC CGT CGG	750 – 767	Burggraf et al., 1997 <sup>30</sup>
ARCH1044	GGC CAT GCA CCW CCT CTC	1044 - 1060	Burggraf, unpubliziert
ARCH1101	GGY RSG GGT CTC GCT CGT T	1101 - 1119	Burggraf et al., 1997 <sup>30</sup>

\* Positionsangaben beziehen sich auf die 16S rRNA von *Escherichia coli*<sup>27</sup>

**Tab. 1 :** Sequenzen der konstruierten Oligonukleotidsonden

Die Hybridisierungsbedingungen wurden für jede Sonde einzeln an Umweltproben des Sippenauer Moores (Probenahmeort Str. 1) mit erhöhtem Archaeen-Gehalt bei einer SDS-Konzentration von 0,005% ermittelt und sind in Tab. 2 dargestellt.

Mit den Sonden ARCH750 und ARCH1101 konnte keine Hybridisierung erreicht werden, weshalb diese im Folgenden nicht weiter verwendet wurden. Funktion und Archaeen-Spezifität der beiden Sonden ARCH345 und ARCH1044 wurden zusätzlich an verschiedenen Vertretern der *Bacteria* und *Archaea* überprüft. Die Archaeen *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrobaculum aerophilum* und *Ignicoccus islandicus* KOL8 konnten mit 0,01% SDS und 20% Formamid im Hybridisierungspuffer mit den Sonden ARCH345 und ARCH1044 gefärbt

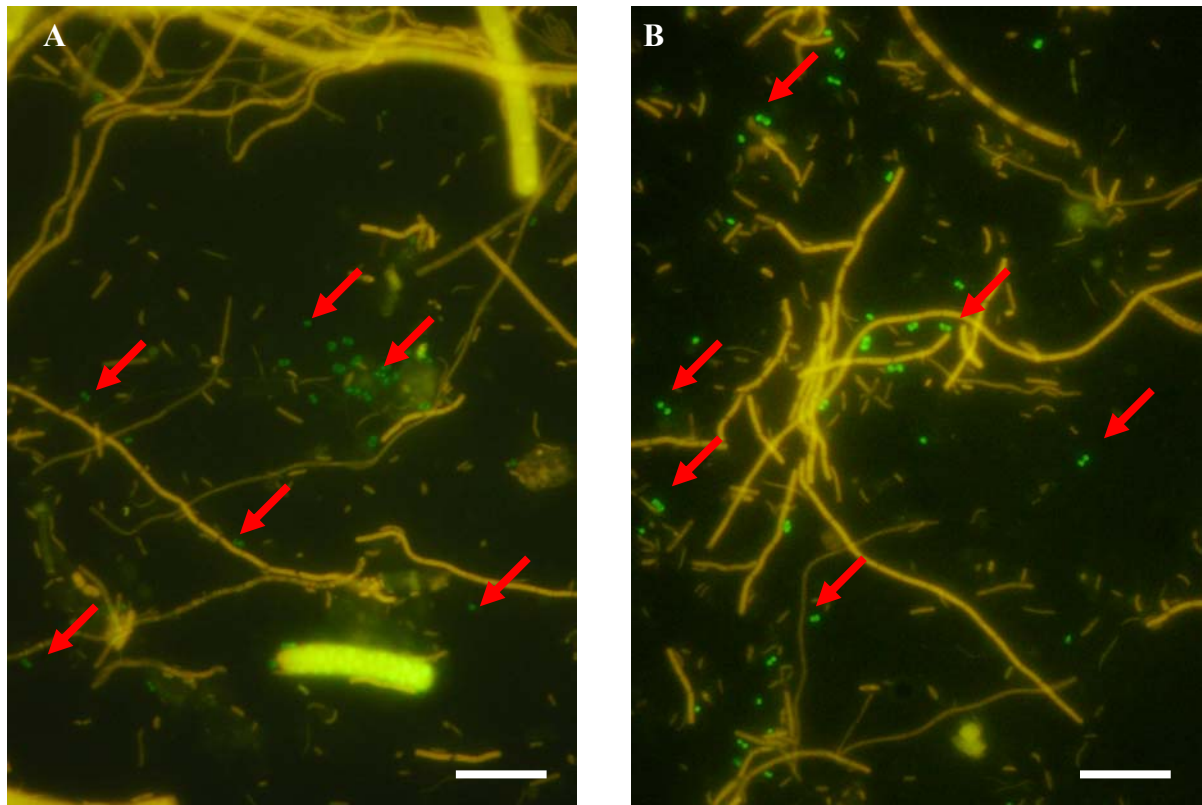
werden. Die Bakterien *Escherichia coli* und *Microvirgula* SG lieferten unter den gleichen Hybridisierungsbedingungen kein Signal. Mit einer Kombination (ARCH-Mix) aus den neuen Sonden ARCH345 und ARCH1044, sowie der Sonde ARCH915, konnten an allen untersuchten Archaeen ein – verglichen mit einzeln eingesetzten Sonden - deutlich stärkeres Signal erhalten werden (Tab. 2, Abb. 7). Jede einzelne Sonde wurde dabei in einer Konzentration von 50 ng eingesetzt, wie sie standardmäßig für Einzelmarkierungen verwendet wurde. Auch mehrmaliges Tieffrieren des Sondengemisches (-20°C), was zur Sondenlagerung notwendig ist, verursachte keine Verminderung der Signalstärke.

Sondenbezeichnung	Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer in % (v/v)					
	0	10	20	30	40	50
ARCH345	++	++	++	++	++	++
ARCH750	-	-	-	-	-	-
ARCH1044	(+)	+	++	++	(+)	-
ARCH1101	-	-	-	-	-	-
ARCH915	++	++	++	++	++	++
ARCH-Mix	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Zeichenerklärung: - kein Signal  
 (+) schwach positiv  
 + positiv  
 ++ stark positiv  
 +++ sehr stark positiv

**Tab. 2:** Signalstärke der konstruierten Sonden bzw. der Sonde ARCH915 in Abhängigkeit der Formamidkonzentration.





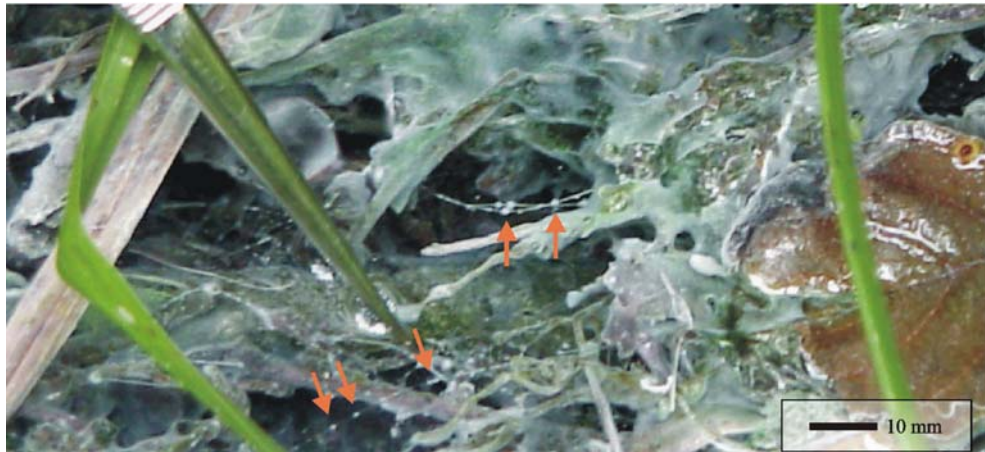
**Abb. 7:** Fluoreszenzaufnahmen FISH-gefärbter Proben des Sippenauer Moores zum Vergleich der Signalstärke verschiedener, archaeeller Sonden. Aufgrund der Sondenmarkierung mit Rhodamin Green™ erscheinen Archaeen grün (rote Pfeile). Bakterien (orange) wurden mit dem Sondengemisch EUB338-Mix CY3 gegengefärbt. Maßstab: 10µm  
 (A) FISH mit der archaeellen Sonde ARCH915.  
 (B) FISH mit dem archaeellen Sondengemisch ARCH-Mix.

### 1.3. Perlenketten: Strukturen mit erhöhtem Archaeengehalt

#### 1.3.1. Makroskopisches Erscheinungsbild

Über einen längeren Zeitraum wurden im Sippenauer Moor eine Vielzahl makroskopisch unterscheidbarer Beläge und flotierender Filamentbüschel auf ihren Archaeengehalt untersucht. Dabei konnten mikrobielle Zellverbände mit einer außergewöhnlichen Struktur entdeckt werden, die mit bloßem Auge erkennbar waren. Kleine, weiße Kugeln waren an einem dünnen, weißlichen Faden aufgereiht und flotierten im Wasser wie eine Perlenkette (Abb. 8). Ein Ende des Fadens, an dem ungefähr zwei bis fünfzehn Perlen linear angeordnet waren, heftete an einer festen Oberfläche (z.B. Äste, Algen, Blätter oder Steine). Die Länge dieser ungewöhnlichen, mikrobiell aufgebauten Strukturen betrug bis zu 15 cm und der Durchmesser einzelner Perlen zwischen 0,5 und 3,0 mm. Die Perlenketten wurden über 30 Monate an der Probenahmestelle Str. 1 im Sippenauer Moor in unterschiedlicher Häufigkeit

nachgewiesen. Ein vermehrtes Auftreten korrelierte mit einer erhöhten Biomasseproduktion und damit mit dem verstärkten Ausbilden von weißen Belägen in den Schwefelquellen des Sippenauer Moores.

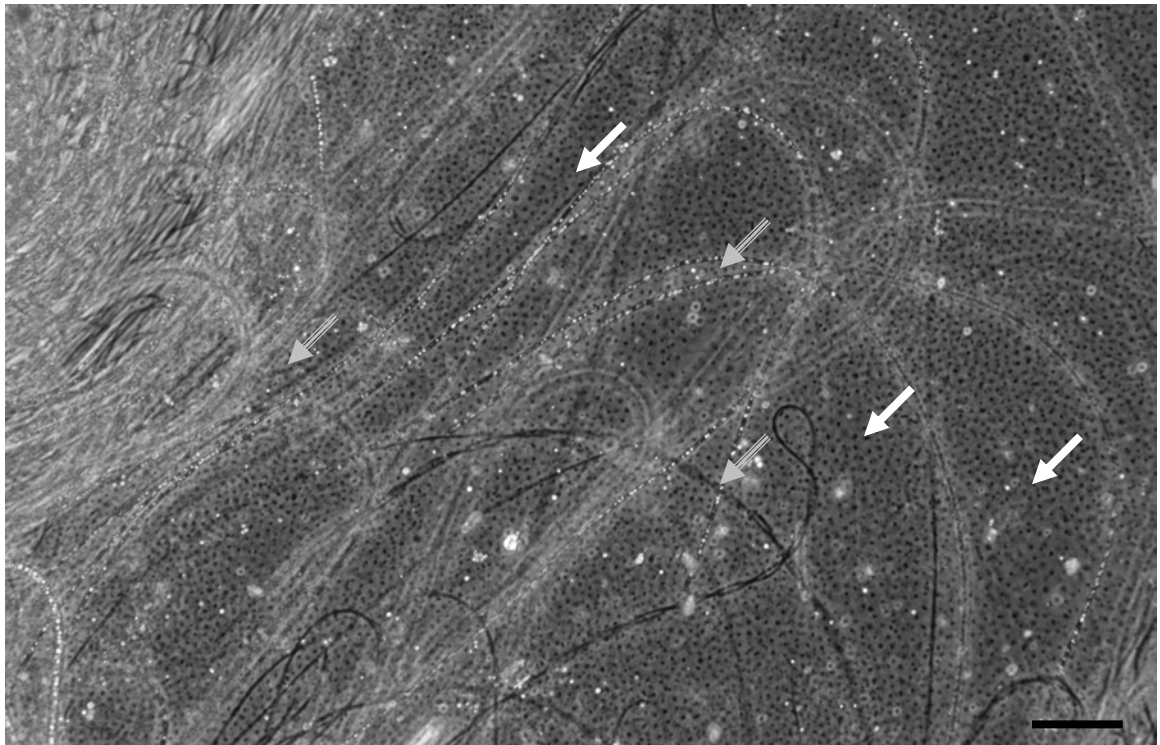


**Abb. 8:** Fotografie von archaeell-bakteriellen Mikrobengemeinschaften, die im sulfidhaltigen Wasser des Sippenauer Moores in charakteristischer Perlenkettenform vorkommen (aus <sup>153a</sup>).

### 1.3.2. Mikroskopisches Erscheinungsbild des Quetschpräparates

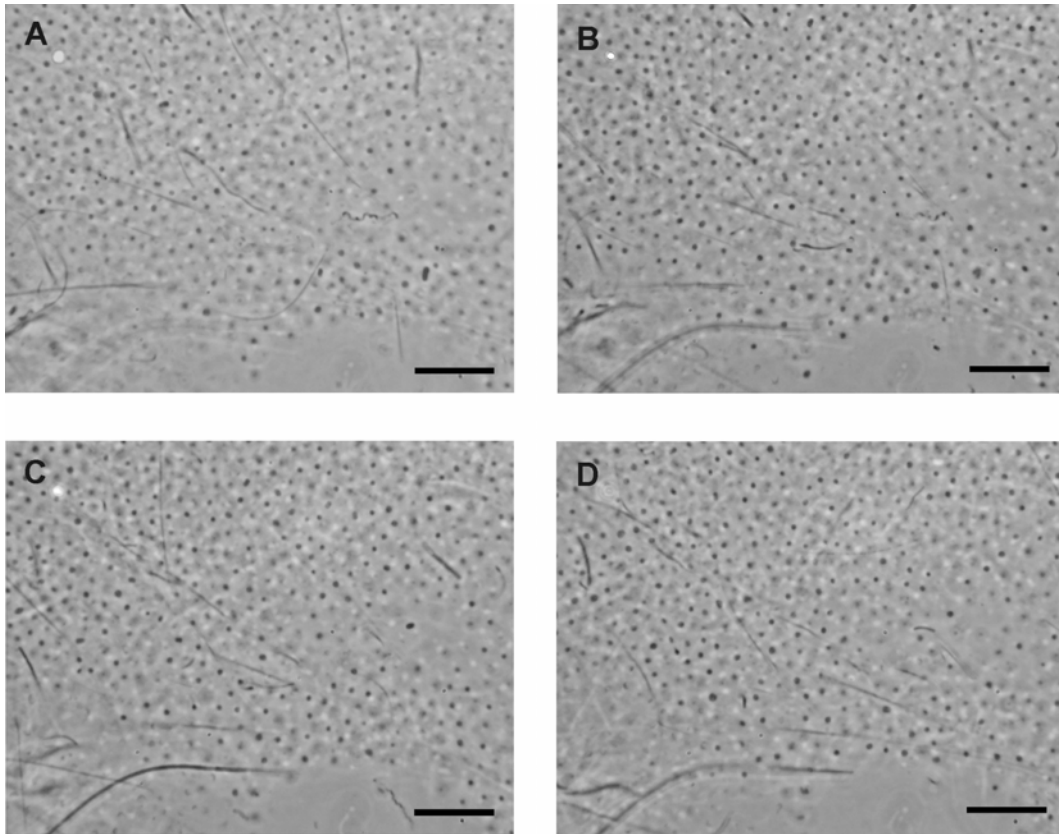
#### 1.3.2.1. Phasenkontrastmikroskopie

Die Morphologie der Mikroorganismen, die am Aufbau der verschiedenartigen Biofilme des Sippenauer Moores beteiligt sind, wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Im Gegensatz zu den FISH-Untersuchungen wurde hierbei das mikroskopische Erscheinungsbild ohne chemische Vorbehandlung der Zellen festgestellt. Während in nahezu allen untersuchten Proben Filamentbildner den häufigsten Morphotyp darstellten, konnten in Quetschpräparaten einzelner Perlen auch große Ansammlungen von kleinen Kokken gefunden werden (Abb. 9).



**Abb. 9:** Phasenkontrastaufnahme eines Quetschpräparates einer Perle (Weiße Pfeile: dreidimensionale Ansammlung archaeeller Kokken; graue Pfeile: beteiligte Filamentbildner). Maßstab: 10µm.

Die einzelnen Zellen schienen in diesen großen Ansammlungen dreidimensional mit definiertem Zell/Zell-Abstand (1-1,5facher Zelldurchmesser) angeordnet zu sein (Abb. 10). Diese strukturierten Kokkenansammlungen konnten in allen untersuchten Perlen während des Bearbeitungszeitraums nachgewiesen werden.

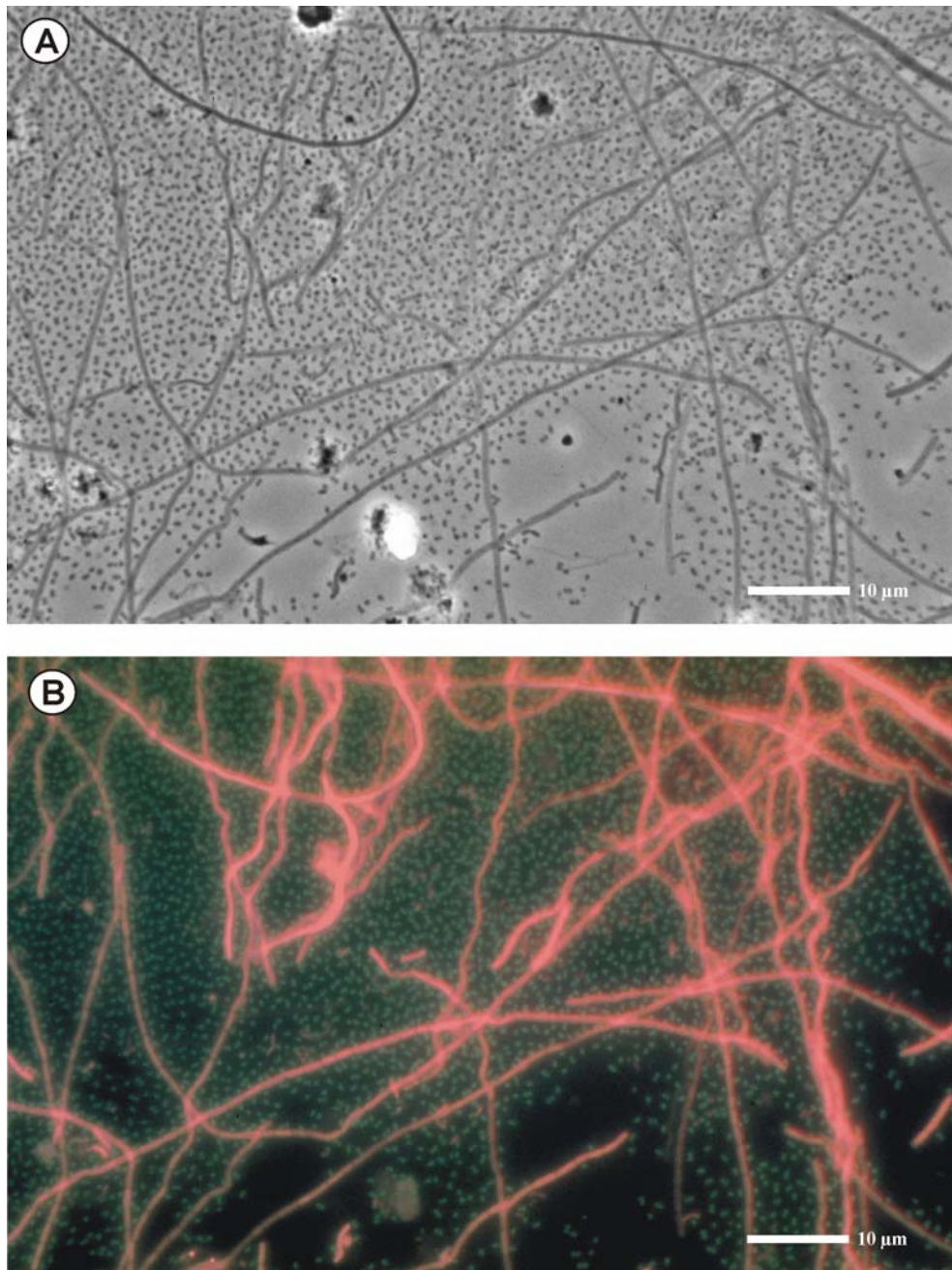


**Abb. 10:** Phasenkontrastaufnahme einer Ansammlung kleiner Kokken in den Perlen.  
(A-D) Aufnahmen verschiedener Ebenen. Maßstab: 10µm

#### 1.3.2.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Verteilung der Archaeen in den verschiedenen Biofilmen des Sippenauer Moores wurde mittels FISH untersucht. In allen untersuchten Proben dominierten filamentbildende Mikroorganismen, deren Ribosomen mit dem bakteriellen Sondengemisch EUB338-Mix hybridisierten. Archaeelle Zellen waren mit dem Sondengemisch ARCH-Mix nur bis zu einem Anteil von 0,01% nachzuweisen und erschienen nach Hybridisierung hantelförmig. Im Gegensatz dazu ergaben FISH-Untersuchungen einzelner Perlen, dass das Innere von Perlen bis zu einem Durchmesser von 3 mm fast ausnahmslos aus archaeellen Kokken (bis zu  $10^7$  Zellen/Perle) bestand (Abb. 11). Positive Hybridisierungssignale mit der spezifischeren Sonde EURY498 erlaubten eine Einordnung dieser Organismen in die *Euryarchaeota*. Mit steigendem Perlendurchmesser (ab 3 mm bis zu 8 mm) nahm die Konzentration der Archaeen einzelner Perlen ab, wobei in diesem Stadium morphologisch unterschiedlichste Bakterien im Inneren nachgewiesen werden konnten. Durch FISH mit bakteriellen Sonden konnte gezeigt werden, dass sich sowohl der äußere Bereich von Perlen als auch der diese verbindende Faden hauptsächlich aus filamentösen Bakterien zusammensetzte. Weiterführende Untersuchungen ordneten diese Filamentbildner hauptsächlich der Gattung *Thiothrix*<sup>118</sup> zu.





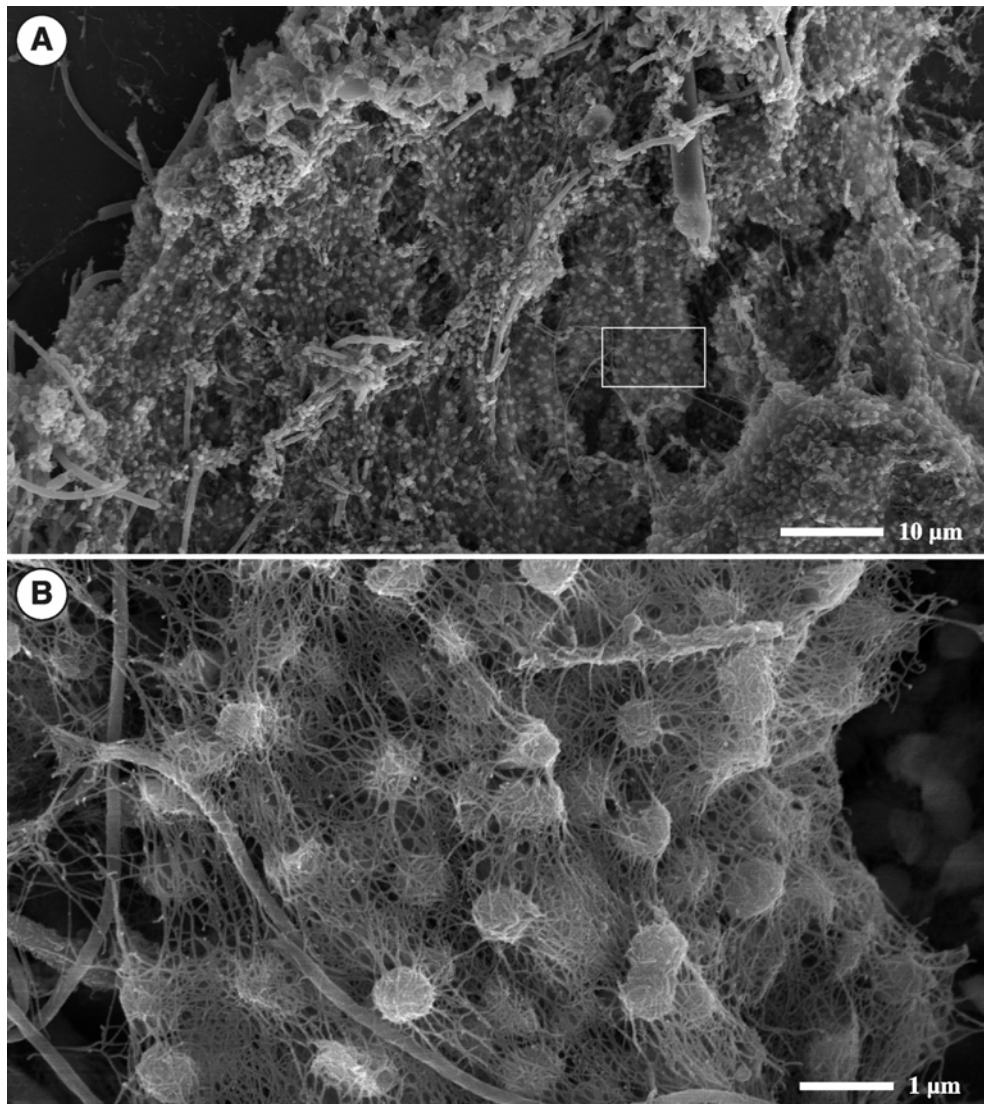
**Abb. 11:** FISH eines Teiles einer Perle (aus <sup>153a</sup>).

(A) Phasenkontrastaufnahme.

(B) Fluoreszenzaufnahme. Doppelmarkierung mit einer Rhodamin Green<sup>TM</sup> markierten, archaeellen Sonde (ARCH915) und einer CY3 markierten, bakteriellen Sonde (EUB338). Archaeen sind grün gefärbt, Bakterien rot.

#### 1.3.2.3. Rasterelektronenmikroskopie

Erste ultrastrukturelle Einblicke in den Aufbau einzelner Perlen konnten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie gewonnen werden. Hierzu wurden Quetschpräparate einzelner Perlen hergestellt und die Zellanordnung unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert, bevor sie für die REM-Untersuchungen vorbereitet wurden (s. II.4.4). Einen Überblick über das Innere der Perlen zeigt Abb. 12A. Neben filamentösen und stäbchenförmigen Mikroorganismen stellen kleine Kokken den stark dominierenden Anteil dar. Der vergrößerte Bildausschnitt in Abb. 12B ermöglicht eine genauere Betrachtung der einzelnen Kokken. Diese Zellen besitzen einen Durchmesser von ca.  $0,6\ \mu\text{m}$  und scheinen mit einem definierten Zell/Zell-Abstand in eine spinnennetzartig erscheinende Matrix eingebettet zu sein. Ob es sich bei dieser Matrix um ein durch die Probenaufarbeitung dehydratisiertes, ursprünglich gelartiges Polymer oder direkte Zell/Zell-Verbindungen handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.



**Abb. 12:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen Perle des Sippenauer Moores (aus <sup>153a</sup>).  
(A) Übersicht über das Innere der Perle.  
(B) Vergrößerter Bildausschnitt des gekennzeichneten Bereichs von A.

### 1.3.3. Modell einer Perle

Aus den gesammelten Daten über Struktur und Zusammensetzung der Perlen im Sippenauer Moor konnte ein erstes, idealisiertes Modell erstellt werden (Abb. 13). Das Innere einzelner Perlen besteht aus den neuartigen SM1-Archaeen, die im definierten, dreidimensionalen Abstand zueinander angeordnet sind. Umgeben werden die Archaeen von filamentösen Bakterien, die größtenteils der Gattung *Thiothrix*<sup>118</sup> angehören. Diese Organismen sind auch hauptsächlich am Aufbau des dünnen, weißen Fadens beteiligt, der die einzelnen Kugeln miteinander verbindet. Oftmals enthielt dieser Faden auch wenige fädige Algen, die vermutlich zur Stabilität beitragen.

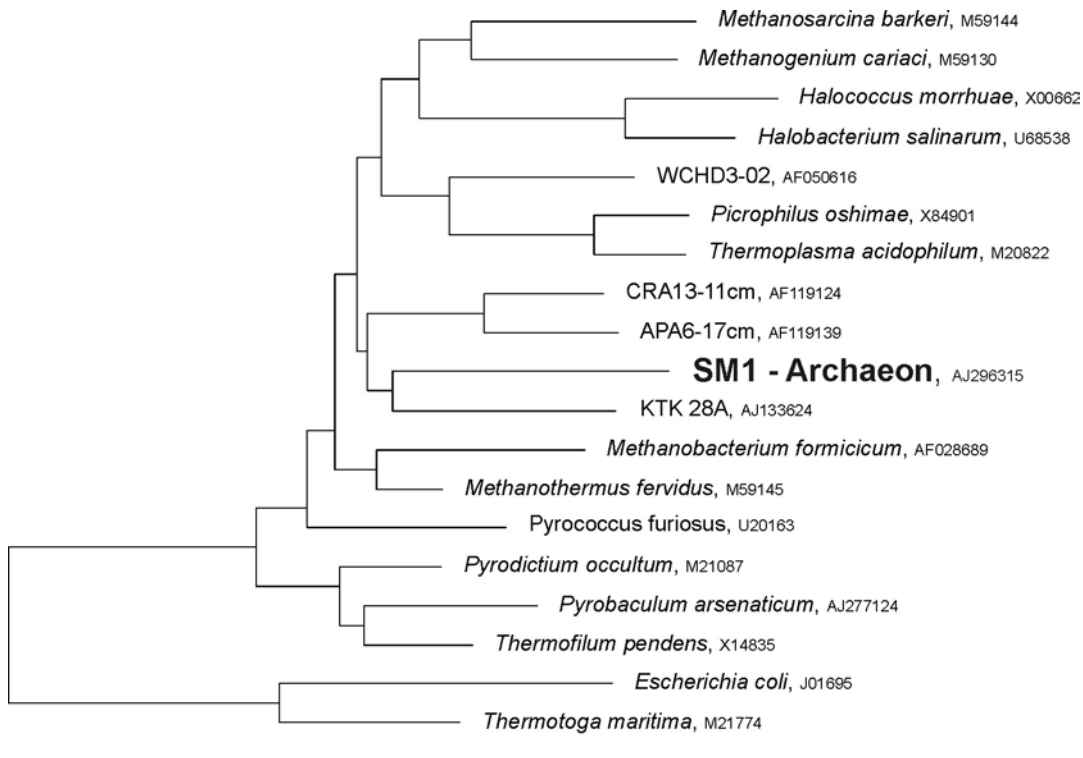


**Abb. 13:** Idealisiertes Modell einer Perle.



#### 1.3.4. Phylogenetische Einordnung der SM1-Archaeen aus den Perlenketten

An der Probenahmestelle Str. 1 im Sippenauer Moor wurde eine einzelne, reinweiße Perle mit einem Durchmesser von ca. 2 mm entnommen. Ein Drittel der Perle wurde abgenommen und mit Hilfe von FISH auf die organismische Zusammensetzung überprüft. Dabei konnte der typische Aufbau nachgewiesen werden (s. III.1.3.2.2.). Nach DNA-Isolierung (s. II.8.1) aus den restlichen zwei Dritteln der Perle wurde eine Standard-PCR (s. II.9.1) durchgeführt, um Amplifikate der archaeellen 16S rRNA-Gene zu erhalten. Dabei konnte mit dem archaeellen Vorwärts-Primer 345aF in Kombination mit allen eingesetzten Rückwärts-Primern (1119aR, 1406uR, 1512uR) ein PCR-Produkt der erwarteten Länge erhalten werden, während mit den archaeellen Vorwärts-Primern 8aF bzw. 109aF keine Amplifikation möglich war. Aufgrund der Länge des PCR-Produktes wurde das Amplifikat mit dem archaeellen Vorwärts-Primer 345aF und dem universellen Rückwärts-Primer 1512uR für eine anschließende Klonierung ausgesucht (s. II.10). Aus einer Vielzahl von Klonen wurden 21 zufällig ausgewählt und mittels Restriktionsverdau (s. II.10.3) verglichen. Alle Klone zeigten dasselbe Restriktionsmuster, was darauf schließen ließ, dass das PCR-Produkt zum überwiegenden Teil aus einem sequenzidentischen Amplifikat bestand. Vier Klone wurden stellvertretend sequenziert und zeigten eine identische Basenfolge mit einem G+C-Gehalt von 52%. Diese Sequenz wurde einem Alignment mit den 16S rRNA-Gensequenzen der ADR (ARB Datenbank Regensburg) unterworfen, wobei Sequenzidentität mit dem schon an der Probenahmestelle Str. 1 im Sippenauer Moor nachgewiesenen Klon SM1K20<sup>153</sup> festgestellt wurde. Ausführliche Baumrekonstruktionsmethoden mit dieser als SM1 bezeichneten Sequenz zeigten, dass der phylogenetische Abstand zu allen bisher kultivierten Organismen mindestens 23% (*Thermoplasma acidophilum*) betrug. Bei den nächstverwandten Sequenzen handelt es sich um Umwelt-Klonsequenzen, so dass über die zugehörigen Organismen keine Aussage getroffen werden kann. Diese Baumtopologie wurde durch die Rekonstruktionsverfahren Distance-Matrix, Maximum-Parsimony und Maximum-Likelihood und dem Einsatz unterschiedlicher Basenfilter (Termini-, *Archaea*-, *Euryarchaeota*-Filter) gestützt. Abb. 14 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, der durch Maximum-Parsimony-Analysen mit Termini- und *Archaea*-Basenfilter erstellt wurde.



**Abb. 14:** Phylogenetischer Stammbaum der 16S rRNA-Gensequenzen basierend auf einer Maximum-Parsimony-Analyse. Kultivierte Organismen sind kursiv gekennzeichnet, Klonsequenzen nicht. Hinter der jeweiligen Bezeichnung wird die Datenbanknummer angegeben (aus <sup>153a</sup>). Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

## 2. Direkter Nachweis der phylogenetischen Position des SM1-Archaeons

### 2.1. Entwicklung einer spezifischen Sonde

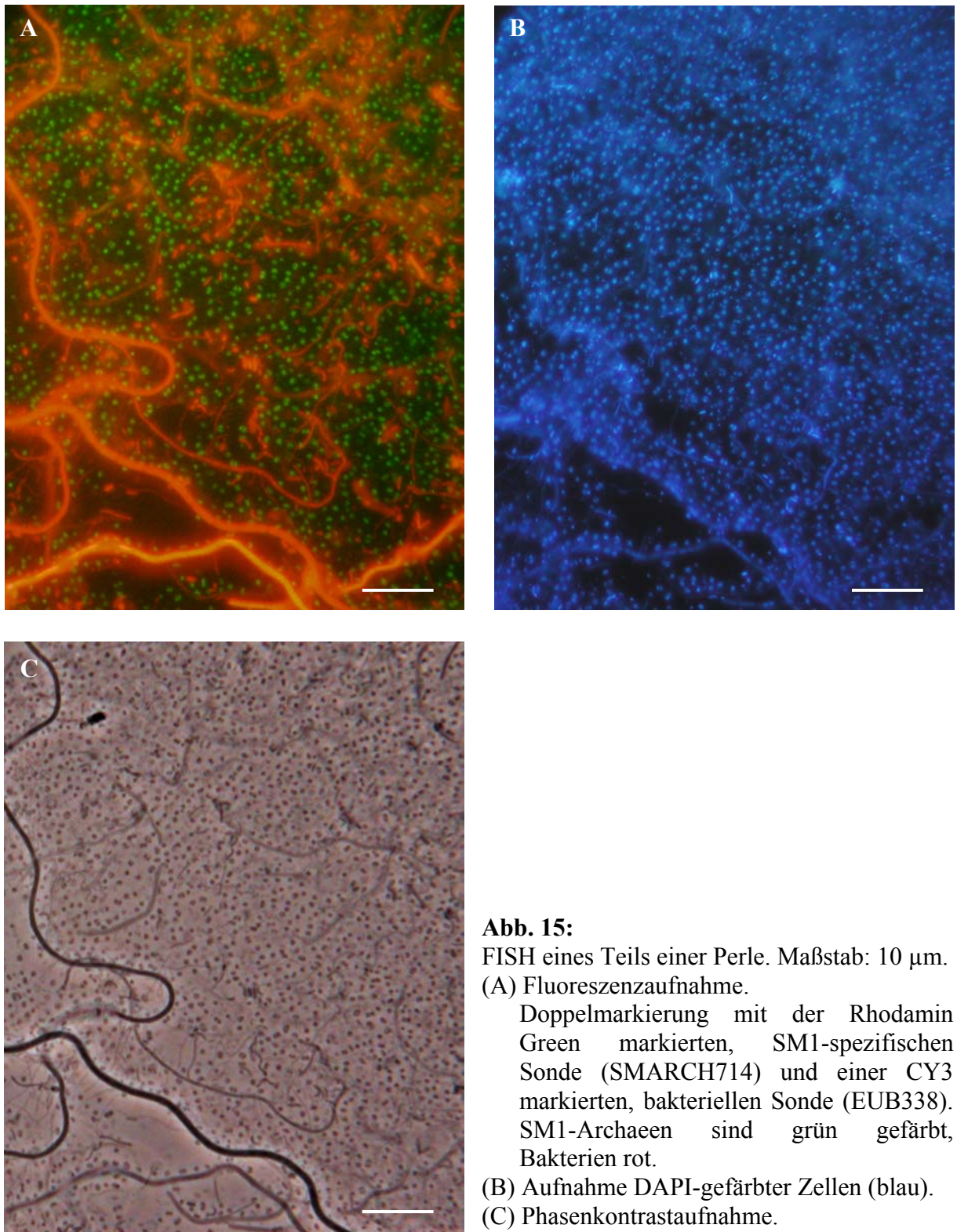
Um zu überprüfen, ob der Sequenzklon aus der phylogenetischen Analyse mit den Archaeen, die mittels FISH nachgewiesen wurden, übereinstimmt, wurde eine SM1-spezifische Sonde konstruiert. Zur Suche geeigneter SONDENSEQUENZEN wurden im ARB-Programm ca. 11.000 16S rRNA-Gensequenzen, die in öffentlichen Datenbanken zugänglich waren, miteinander verglichen und für die SM1-Sequenz spezifische Genabschnitte bestimmt. Bei der SONDENAUSWAHL wurde zum einen die Zugänglichkeit des jeweiligen Genabschnittes der 16S rRNA für Oligonukleotide anhand der bekannten Struktur aus *Escherichia coli* berücksichtigt <sup>62</sup>. Zum anderen wurden Sequenzabschnitte gewählt, die sich in mindestens drei Basen zu den 16S rRNA-Gensequenzen aller bekannten Organismen unterschieden. Durch die Kombination dieser beiden Auswahlkriterien konnten zwei Sonden – SMARCH402 und SMARCH714 - konstruiert werden (Tab. 3), die ein falschpositives Hybridisierungssignal mit Kontrollorganismen ausschließen lassen.

Sondenbezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position <sup>1</sup>
SMARCH402	CTC CAA ATG GAG GAA CTC	402 - 434
SMARCH714	GCC TTC GCC CAG ATG GTC	714 - 732

<sup>1</sup> Positionsangaben beziehen sich auf die 16S rRNA von *Escherichia coli* <sup>27</sup>

**Tab. 3:** Sequenzen und Positionen der SM1-spezifischen Sonden.

Die Zugänglichkeit der 16S rRNA für diese Sonden wurde an Perlen vom Probenahme-standort Str. 1 mit 0,01% SDS-Konzentration und verschiedenen Formamidkonzentrationen (0%, 10%, 20%, 30%, 40% und 50%) im Hybridisierungspuffer überprüft. Während die Sonde SMARCH402 kein Hybridisierungssignal lieferte, konnte mit der Sonde SMARCH714 bei allen Formamidkonzentrationen ein positives Signal erhalten werden (Abb. 15). Die Spezifität der Sonde SMARCH714 wurde an den Archaeen *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrobaculum aerophilum* und *Ignicoccus islandicus* KOL8, sowie den Bakterien *Escherichia coli* und *Microvirgula* SG überprüft. Diese Mikroorganismen lieferten unter den Hybridisierungsbedingungen des SM1-Archaeons kein Signal. Mit diesem optischen Nachweis konnte die SM1-Sequenz, die über eine Phylogenie erhalten wurde, den Archaeen aus den Perlenketten zugeordnet werden.



**Abb. 15:**

FISH eines Teils einer Perle. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

(A) Fluoreszenzaufnahme.

Doppelmarkierung mit der Rhodamin Green markierten, SM1-spezifischen Sonde (SMARCH714) und einer CY3 markierten, bakteriellen Sonde (EUB338). SM1-Archaeen sind grün gefärbt, Bakterien rot.

(B) Aufnahme DAPI-gefärbter Zellen (blau).

(C) Phasenkontrastaufnahme.

## 2.2. Phylogenetische Einordnung von spezifisch markierten Archaeen aus einer Umweltprobe mit einem Laserkatapult am Beispiel der SM1-Archaeen

Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist es möglich, Umweltproben auf deren organismische Zusammensetzung hin zu untersuchen. Dabei werden oftmals Sonden eingesetzt, die ausschließlich auf der Basis von Umweltsequenzen konstruiert wurden. Häufig fehlen Reinkulturen verwandter Organismen und eine Kontrolle der Sondenspezifität an Umweltorganismen, wie im Fall der SM1-Archaeen, ist nur selten möglich. FISH gekoppelt mit einer anschließenden 16S rRNA-Gensequenzanalyse würde eine sehr gute Kontrollmöglichkeit darstellen. Im Folgenden wurden einige Vorversuche zu dieser neuen Technik durchgeführt.

### 2.2.1. Nachweisgrenze bei Ganzzell-PCR

Mit einem Laserkatapult werden unter optischer Kontrolle fixierte Zellen ausgewählt und in ein PCR-Cup katapultiert. Diese Zellen werden anschließend in eine Ganzzell-PCR eingesetzt, weshalb die Nachweisgrenze der Ganzzell-PCR die Auflösung der Methode beeinflusst. Mit Verdünnungsreihen aufkonzentrierter SM1-Archaeen wurde die Nachweisgrenze einer Ganzzell-PCR ermittelt. Dazu wurde die Zellzahl der unverdünnten Probe, sowie zur Kontrolle die der 1:10-Verdünnung, mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt (Tab. II.4.2).

Proben-verdünnung	Zellzahl/ml	Zellzahl/PCR-Ansatz	Lightcycler-Signal	Thermocycler-Signal
unverdünnt	$1,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^5$	n.d.	+
1:10	$1,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^4$	+	+
1:100	$1,6 \times 10^6$	3.200	+	+
1:1000	$1,6 \times 10^5$	320	+	+
1:10.000	$1,6 \times 10^4$	32	+	-
1:100.000	1.600	3	+	-

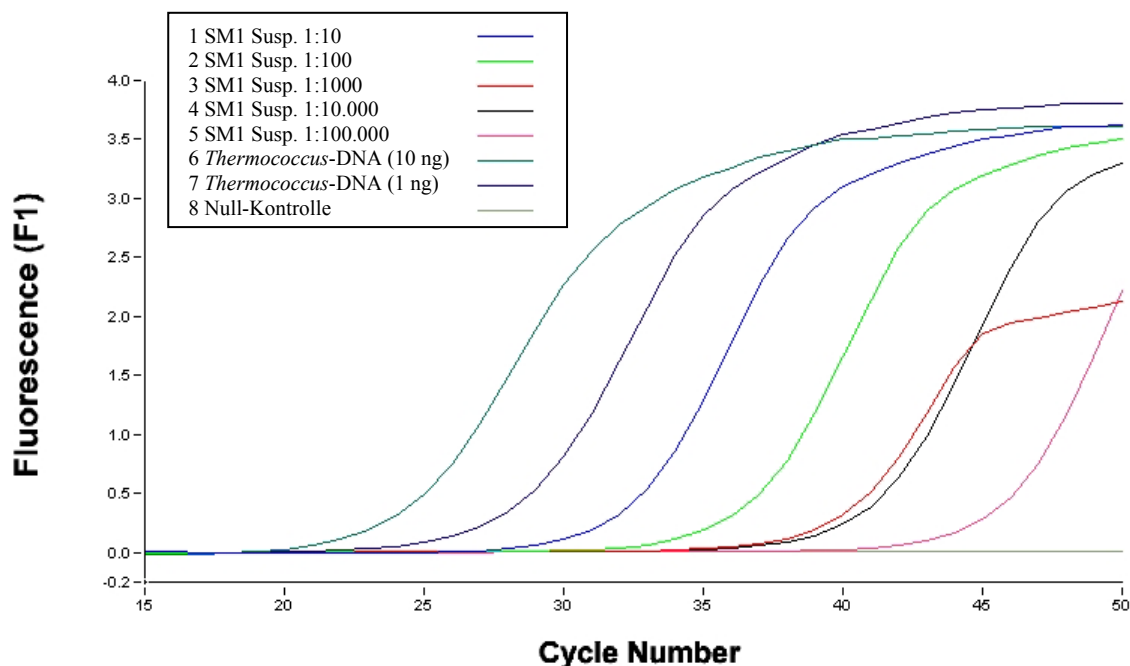
+ positiv

- negativ

n.d. nicht nachgewiesen

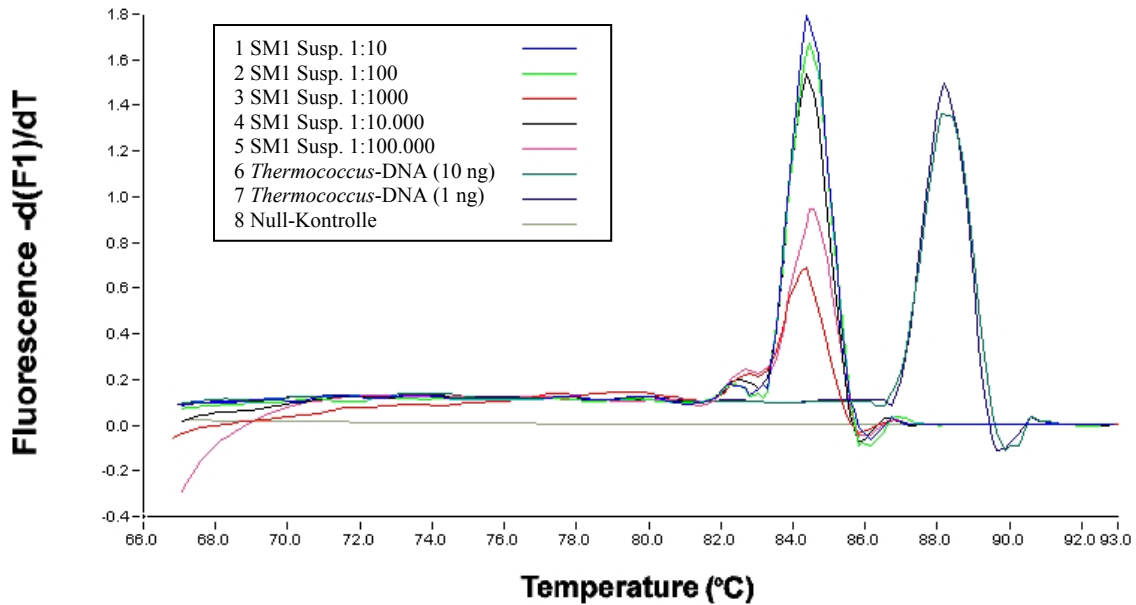
**Tab. 4:** Eingesetzte Zellzahlen FISH-gefärbter Zellen) und Amplifikationsfähigkeit in PCR-Ansätzen mit Lightcycler bzw. Thermocycler.

Anschließend wurde diese Verdünnungsreihe in PCR-Ansätze eingesetzt. Die Versuche wurden mit den Primern 345aF – 1119aR sowohl mit dem Standard-Programm im Thermocycler als auch in einem Lightcycler durchgeführt. Während im Thermocycler mit 32 Zellen kein PCR-Signal mehr erhalten wurde, konnte im Lightcycler noch mit 3 Zellen eine Amplifikation erreicht werden (Abb. 16). Die in Abb. 16 im PCR-Ansatz erkennbare Zunahme an Amplifikat wurde durch Zusatz des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR® Green nachgewiesen. Hierbei lässt sich erkennen, dass die feststellbare Zunahme des PCR-Produktes in den Ansätzen nach einer unterschiedlichen Anzahl von Zyklen erfolgte und somit von der Menge eingesetzter Zellen abhing. Die Kurven der 1:1000 und 1:10.000-Verdünnung zeigen in etwa nach der gleichen Zyklenzahl den Anstieg an PCR-Produkt, jedoch brach die Amplifikation bei der 1:1000-Verdünnung schon viel früher ab. Der Grund hierfür ist nicht bekannt, aber es wäre denkbar, dass PCR-hemmende Begleitsubstanzen aus der Umweltprobe eingeschleppt wurden.



**Abb. 16:** Quantifizierung der PCR-Produkte (Primer 345aF – 1119aR) einer Ganzzell-PCR in Abhängigkeit verschiedener Zellkonzentrationen des SM1-Archaeons.

Als Kontrolle wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Abb. 17 zeigt bei allen PCR-Produkten die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Temperatur. Beim Schmelzpunkt der DNA wird schlagartig interkalierendes SYBR® Green freigesetzt, was zu einer starken Änderung der Fluoreszenzintensität führt und das Maximum in Abb. 17 darstellt. Die Schmelzpunktkurven aller PCR-Produkte der Verdünnungsreihe zeigen das gleiche Maximum. Dies entspricht einem gemeinsamen Schmelzpunkt, was auf identische PCR-Produkte schließen lässt.

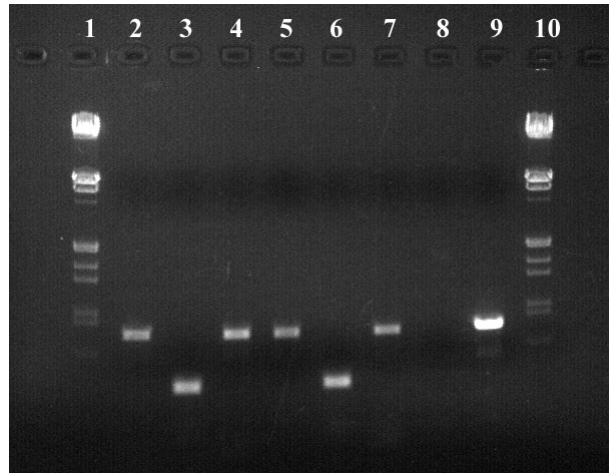


**Abb. 17:** Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte (Primer 345aF – 1119aR) einer Ganzzell-PCR mit verschiedenen Zellkonzentrationen des SM1-Archaeons.

### 2.2.2. PCR-Nachweisgrenze von FISH-hybridisierten Zellen

#### 2.2.2.1. Sondenauswahl (PCR)

Die Amplifizierbarkeit von DNA in Anwesenheit standardmäßiger und modifizierter FISH-Sonden sollte mit einer Standard-PCR am Beispiel der SM1-Archaeen gezeigt werden. Neben dem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende wurden diese modifizierten Sonden noch mit einem Phoslink am 3'-Ende ausgestattet. Eine PCR (Primer: 345aF – 1119aR) mit Umwelt-DNA einer Aufreinigung aus dem Sippenauer Moor (s. II.7.4) und von gallertartigen Ansammlungen des SM1-Archaeons aus dem Islinger Mühlbach (s. II.7.7) ergaben das gleiche Ergebnis. Hierbei konnte ein PCR-Fragment der erwarteten Größe nur bei Zugabe der modifizierten Sonde Phos-SMARCH714 (mit Phoslink; 50 ng) erhalten werden (Abb. 18). Die PCR-Ansätze mit den nicht modifizierten Sonden (ohne Phoslink; 50 ng) lieferten mit  $<<500$  bp ein wesentlich kleineres PCR-Produkt, was darauf schließen lässt, dass die Sonde SMARCH714 in diesem Fall als Rückwärtsprimer fungierte (Abb. 18). Die Funktion von nicht modifizierten FISH-Sonden als Rückwärtsprimer wurde neben der Sonde SMARCH714 auch mit der Sonde ARCH345 nachgewiesen.



**Abb. 18:** Aufgetrennte PCR-Produkte (Primer: 345aF – 1119aR) zur Überprüfung der Amplifikationsfähigkeit nach Zusatz modifizierter FISH-Sonden.

- 1 Standard (Eco RI/Hind III-verdaute DNA des Phagen  $\lambda$ )
- 2 SM1-DNA [Sippenauer Moor] (10 ng)
- 3 SM1-DNA [Sippenauer Moor] (10 ng) + Sonde SMARCH714 ohne Phoslink (50 ng)
- 4 SM1-DNA [Sippenauer Moor] (10 ng) + Sonde SMARCH714 mit Phoslink (50 ng)
- 5 SM1-DNA [Islinger Mühlbach] (10 ng)
- 6 SM1-DNA [Islinger Mühlbach] (10 ng) + Sonde SMARCH714 ohne Phoslink (50 ng)
- 7 SM1-DNA [Islinger Mühlbach] (10 ng) + Sonde SMARCH714 mit Phoslink (50 ng)
- 8 Nullkontrolle
- 9 Positivkontrolle (*Thermococcus celer*-DNA)
- 10 Standard (Eco RI/Hind III-verdaute DNA des Phagen  $\lambda$ )

#### 2.2.2.2. Nachweisgrenze FISH-hybridisierter Zellen

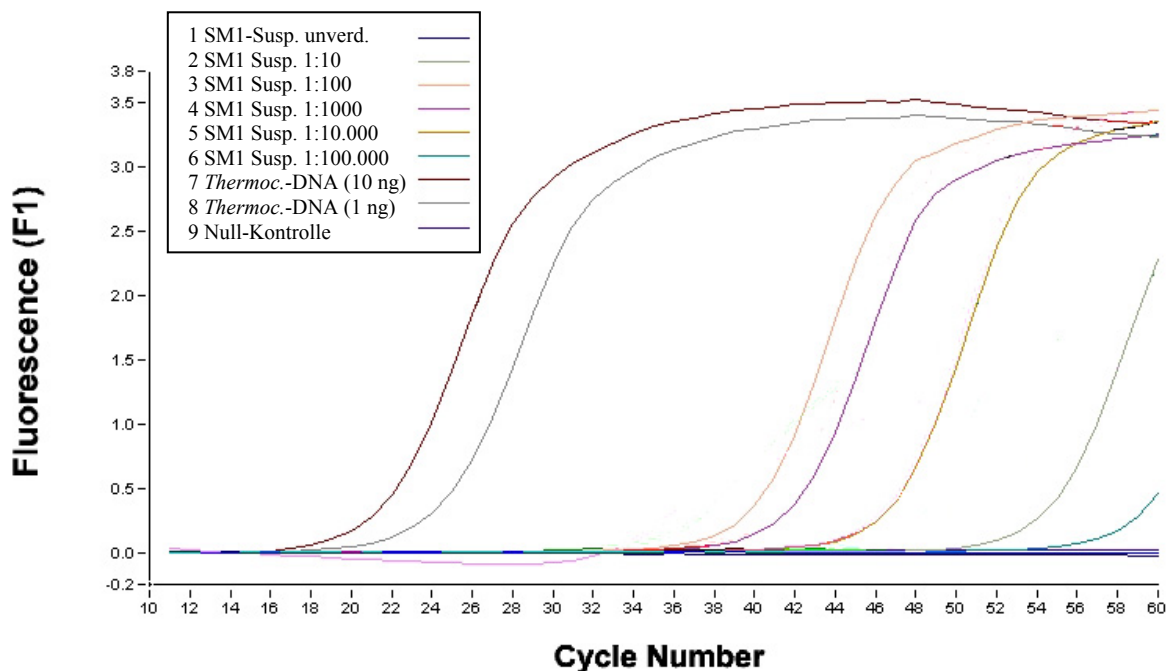
Aufkonzentrierte SM1-Archaeen wurden durch eine Ganzzell-Hybridisierung in Suspension mit der modifizierten Sonde Phos-MARCH714 markiert (s. II.12.5.2). Aufgrund der die Taq-Polymerase hemmenden Wirkung von SDS wurde in dieser Hybridisierung Tween20 als Detergens eingesetzt. Anschließend wurde die Reinheit der aufkonzentrierten SM1-Archaeen unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert (Anteil SM1-Archaeen >98%), die Zellzahl in dem Hybridisierungsansatz mittels Thoma-Zählkammer ermittelt und eine Verdünnungsreihe hergestellt (Tab. 5).



Proben-verdünnung	Zellzahl/ml	Zellzahl/PCR-Ansatz	Lightcycler-Amplifikation	Thermocycler-Amplifikation
unverdünnt	$1,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^5$	-	-
1:10	$1,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^4$	+	+
1:100	$1,6 \times 10^6$	3.200	+	+
1:1000	$1,6 \times 10^5$	320	+	+
1:10.000	$1,6 \times 10^4$	32	+	-
1:100.000	1.600	3	+	-

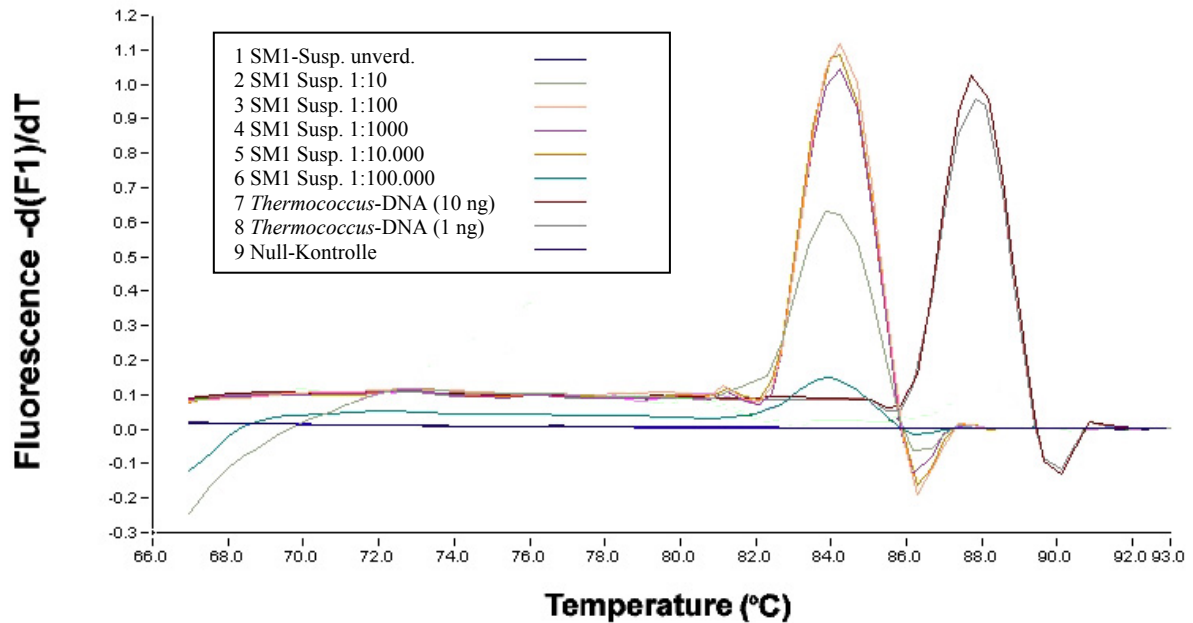
**Tab. 5:** Eingesetzte Zellzahlen FISH-gefärbter Zellen (Sonde: Phos-SMARCH714) und Amplifikationsfähigkeit in PCR-Ansätzen mit Lightcycler bzw. Thermocycler.

Eine PCR mit dieser Verdünnungsreihe lieferte im Lightcycler bis zur höchsten Verdünnungsstufe (3 Zellen/PCR-Ansatz) ein Amplifikat der erwarteten Größe, während im Thermocycler die Standard-PCR der Verdünnungsstufe 1:1000 erst nach einer Reamplifikation erfolgreich war. Die PCR-Ansätze mit den unverdünnten Proben waren in beiden Geräten negativ, was an einer zu hohen Zellkonzentration liegen könnte.



**Abb. 19:** Quantifizierung der PCR-Produkte (Primer: 345aF – 1119aR) einer Ganzzell-PCR mit einer Verdünnungsreihe FISH-gefärbter SM1-Archaeen (Sonde: Phos-SMARCH714).

Die Schmelzpunktkurven aller PCR-Produkte der Verdünnungsreihe zeigen das gleiche Maximum (Abb. 20). Dies entspricht einem gemeinsamen Schmelzpunkt, was auf identische PCR-Produkte schließen lässt.



**Abb. 20:** Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte (Primer 345aF – 1119aR) einer Ganzzell-PCR mit verschiedenen Zellkonzentrationen FISH-gefärbter SM1-Archaeen.

### 2.2.3. Vorversuche zur Vereinzelung der hybridisierten Zellen mit dem Laserkatapult

Mit dem Laserkatapult werden Zellen oder Gewebe vereinzelt, die auf einer Polyethylen-Folie (Dicke 1  $\mu\text{m}$ ) aufgebracht wurden. Diese Folie wird anschließend mit einem UV-Laser (260 nm) durchtrennt und die Zellen in einen befeuchteten PCR-Cup-Deckel katapultiert. Bei der standardmäßig eingesetzten Polyethylen-Folie war aufgrund der schlechten UV-Eigenschaften (hohe Eigenfluoreszenz) die Detektion FISH-gefärbter Zellen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Eigenfluoreszenz und das UV-Spektrum von Folien anderer Materialien (Haushaltsfolie, Triacetat-Folie) getestet. Die Prüfung auf Eigenfluoreszenz erfolgte direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop an FISH-gefärbten Zellen (Ganzzell-Hybridisierung in Suspension). Hierbei stellten sich die Haushaltsfolie und die Triacetat-Folie als geeignet heraus. Die anschließende, photometrische Prüfung des UV-Spektrums ergab, dass die Triacetat-Folie im Gegensatz zur Haushaltsfolie bei 260 nm Absorption zeigte (Tab. 6), was für das Schneiden mit dem UV-Laser notwendig ist. Eine Überprüfung der Schnittfähigkeit mit dem UV-Laser (260 nm) erfolgte am Laserkatapult. Während bei der Haushaltsfolie mit dem Laser keine Reaktion hervorgerufen wurde, konnten in die Triacetat-Folie sichtbare

Schnittkanten eingebrannt werden. Aufgrund der Dicke (55 µm) dieser Testfolie war eine vollständige Durchtrennung allerdings nicht möglich. Dünnere Triacetat-Folien für weitere Versuche konnten aus Zeitgründen nicht mehr beschafft werden. Auf der Triacetat-Folie konnte auch eine trägergebundene FISH durchgeführt werden, nach der die hybridisierten Einzelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich zu erkennen waren.

Folie	Dicke	Bezugsquelle	Absorption
Polyethylen-Folie	1 µm	Fa. Palm, Bernried	<375 nm
Haushalts-Folie „Toppits“	n.d.	Melitta, Minden	<230 nm
Triacetat-Folie	55 µm	Fa. Bauer GmbH, Starnberg	<275 nm

n.d. nicht bekannt

**Tab. 6:** Absorption der untersuchten Folien.

### 3. Bestimmung von Umweltparametern

#### 3.1. Optodenmessung in den Mikrokompartimenten der SM1-Archaeen

Die verschiedenen Bedingungen des Mikrohabitates der SM1-Archaeen wurden in den Perlenketten mit Hilfe spezieller Optoden gemessen. Diese bestehen aus Glasspitzen, die von einem Fluoreszenzfarbstoff umgeben sind, welcher eine hohe Sensitivität für den jeweiligen Parameter aufweist. Der Aufbau einer Optode ist sehr klein (Ø ca. 20 µm) und erlaubte somit Messungen selbst im Inneren der Perlen.

##### 3.1.1. Ermittlung des pH-Wertes

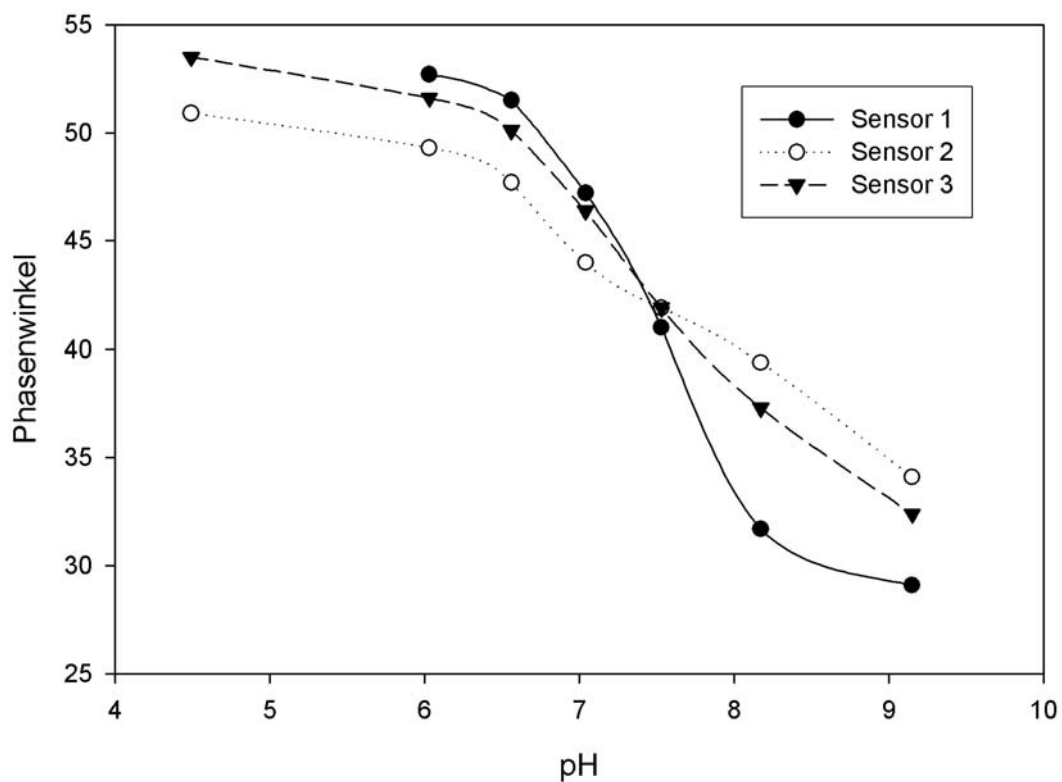
Zur Messung des pH-Wertes in einzelnen Kugeln der Perlenketten wurden pH-Optoden der Fa. Presens (Precision Sensing GmbH, Neuburg a.d. Donau) eingesetzt. Hierbei handelte es sich um neuentwickelte Prototypen, die im Vergleich zu den Sauerstoff-Optoden eine geringere Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes aufwiesen, wodurch die Verwendung mehrerer Optoden notwendig war. Nachdem bei gleichem pH-Wert jede Optode einen anderen Phasenwinkel besitzt, mussten sie vor Versuchsbeginn kalibriert werden. Dies erfolgte vor Ort in vorbereiteten, im Moorwasser temperierten Eichlösungen (Tab. 7) bis die Messwerte

stabil waren. Die Messung der Proben lieferte dann einen Phasenwinkel, dem durch den jeweiligen Kalibrierungsgraphen (Abb. 21) ein pH-Wert zugeordnet werden konnte.

pH-Wert	Sensor 1 Phasenwinkel	Sensor 2 Phasenwinkel	Sensor 3 Phasenwinkel
4,49	n.d.	50,9	53,5
6,03	52,7	49,3	51,6
6,56	51,5	47,7	50,1
7,04	47,2	44,0	46,4
7,53	41,0	41,9	41,9
8,17	31,7	39,4	37,3
9,15	29,1	34,1	32,4

n.d.: kein Messwert

**Tab. 7:** Phasenwinkel der verschiedenen Sensoren bei unterschiedlichen pH-Werten.



**Abb. 21:** Kalibrierungskurven der verschiedenen pH-Sensoren.

Zur Messung wurde eine Perle direkt im Bachlauf an der Probenahmestelle Str. 1 mit einer aus Objekträgern konstruierten Glasrinne von unten vorsichtig stabilisiert, so dass die Bewegung möglichst eingeschränkt wurde (Abb. 22A). Die Optode war an einem schweren Stativ befestigt und konnte mit einem Mikromanipulator dreidimensional sehr genau bewegt werden. Eine einzelne Messung dauerte 3 min, währenddessen jede Minute der Phasenwinkel ermittelt wurde. Der mittlere Phasenwinkel wurde anschließend zur pH-Wert-Bestimmung (Abb. 21) herangezogen und mit dem Wert des Wassers direkt an der Perle verglichen. Weitere Messungen fanden direkt vor Ort an Kugeln statt, die kurz zuvor aus dem Biotop entnommen wurden und deren innerer pH-Wert in einer Petrischale bestimmt wurde (Abb. 22B, Tab. 8).

Bei sechs solcher Proben, die aus dem Biotop entnommen wurden, ergab sich jeweils ein pH-Wert von 6,5 bis 6,7. Die Messung der Perle direkt im Biotop ergab mit 7,1 einen ähnlichen pH-Wert wie das Umgebungswasser mit einem pH-Wert von 7,2. Möglicherweise wurde der Sensor aufgrund der schwierigen Sichtverhältnisse im Biotop nicht weit genug in das Perleninnere eingebracht, so dass das Umgebungswasser die Messung beeinflusste.



**Abb. 22:** Messung des pH-Wertes in Perlen am natürlichen Standort im Sippenauer Moor.  
(A) Messung direkt in der Strömung ohne Entnahme der Perlen.  
(B) Versuchsaufbau zur Messung in den Perlen direkt nach Entnahme.

Probe	Phasenwinkel					Sensor	pH-Wert
	0 min	1 min	2 min	3 min	Mittelwert		
Umgebungs- wasser	45,1	46,5	46,7	n.d.	46,1	1	7,2
Perle (im Biotop)	47,0	46,9	46,9	47,0	47,0	1	7,1
Perle (entn.)	46,6	47,2	47,3	47,4	47,1	2	6,6
Perle (entn.)	45,8	45,9	46,4	46,6	46,2	2	6,7
Perle (entn.)	49,7	49,5	51,0	50,8	50,3	3	6,5
Perle (entn.)	51,0	50,5	50,3	50,4	50,6	3	6,5
Perle (entn.)	49,3	49,4	49,3	49,4	49,4	3	6,6
Perle (entn.)	50,4	50,6	50,0	n.d.	50,3	3	6,5

**Tab. 8:** Phasenwinkel und pH-Werte der untersuchten Proben.

### 3.1.2. Sauerstoff-Gehalt

Der Sauerstoffverträglichkeit eines Mikroorganismus stellt ein wesentliches Kriterium bei der Kultivierung dar. Aus diesem Grund wurde der Sauerstoffgehalt an verschiedenen Stellen des Probenahmestandortes Str. 1, teilweise direkt an einzelnen Perlen bestimmt. Die Messungen erfolgten direkt im Biotop, um eine nachträgliche Sauerstoffdiffusion zu unterbinden, wie sie bei der Entnahme einzelner Perlen zur Messung im Inneren passieren könnte. Nachdem photosynthetische Organismen nicht regelmäßig am Aufbau der Perlen beteiligt waren (s. III.1.3.3) wurde die Sauerstoffkonzentration in den Perlen als maximal gleich der Umgebungskonzentration angenommen. Der Sauerstoffgehalt wird im Sippenauer Moor durch Verwirbelung bzw. durch Reduktion durch das vorhandene Sulfid stark beeinflusst. Aus diesem Grund erfolgten die Messungen an verschiedenen Stellen des Probenahmestandortes Str. 1 (s. III.4.1.1.2.1; Abb. 23), deren Ergebnisse Tab. 9 zeigt.

Messpunkt	Beschreibung der Messstelle	O <sub>2</sub> -Gehalt (% Luftsättigung)
1	Starke Verwirbelung in 1 cm Tiefe	8,4 – 9,0
2	Starke Verwirbelung direkt am Quellaustritt	50
3	1 cm unter der Wasseroberfläche	6,0
3	2 cm unter der Wasseroberfläche	5,5
3	4 cm unter der Wasseroberfläche	4,6 – 4,7
4	Weißer Belag in starker Strömung (1 cm unter der Wasseroberfläche)	7,7 – 8,0
5	Wasser kurz vor Ende des ersten Quellbeckens	8,0 – 8,6
6	Stilles Wasser der zweiten Schwefelquelle unter der großen Wurzel	3,5 – 4,3
7	Wasser direkt an „Perlenketten“	6,8 – 7,3
8	1 cm unter der Wasseroberfläche (Ruhiges Wasser)	3,0 – 3,5
8	4 cm unter der Wasseroberfläche (Ruhiges Wasser)	3,0 – 3,5
9	Direkt an Perlenketten ca. 0,5 m vor großem Quelltopf in 4 cm Tiefe	1,0 – 3,0
10	Boden des Quelltopfes ca. 10 m unterhalb des Quellaustritts	< 2,0

**Tab. 9:** Sauerstoffgehalte des Quellwassers an verschiedenen Messpunkten (Abb. 23).

An stark verwirbelten Stellen erreichte die Sauerstoff-Konzentration mit bis zu 9% Luftsättigung (Messpunkt 1) auch die höchsten gemessenen Werte. Im Gegensatz dazu konnten bei geringer Dynamik des Wassers Werte ab 1% Luftsättigung (Messstelle 9) ermittelt werden. Direkt an den Perlenketten wurden Sauerstoffkonzentrationen von 1,0% Luftsättigung bis zu 7,3% Luftsättigung je nach Strömung des Wassers an dem jeweiligen Messpunkt bestimmt.





**Abb. 23:**  
Messpunkte an der Probenah-  
mestelle Str. 1 im Sippenauer  
Moor.

### 3.2. Chemische Wasseranalysen des Sippenauer Moores im Vergleich mit anderen Schwefelquellen

Ein Vergleich der Wasserzusammensetzung sulfidhaltiger Quellen sollte Aufschluss über Ionenverhältnisse liefern, die mit dem Vorkommen von SM1-Archaeen korrelieren. An der wiederholten Wasseranalyse im Sippenauer Moor lässt sich die natürliche Schwankung der chemischen Zusammensetzung von schwefelhaltigem Wasser einer Quelle erkennen, die aber ohne Auffälligkeiten bleibt. Sowohl bei der Analytik am 30.03.1999 als auch am 12.02.2002 wurden ausgedehnte, weiße Biofilme am Probenahmeort Str. 1 festgestellt.



<b>Anionen</b>	<b>Sippenauer Moor</b> 30.03.1999 (mg/l)	<b>Sippenauer Moor</b> 12.02.2002 (mg/l)	<b>Islinger Mühlbach</b> 12.02.2002 (mg/l)	<b>Irnsing</b> 13.02.2002 (mg/l)	<b>Teugn</b> 12.02.2002 (mg/l)
$\text{SO}_4^{2-}$	27	31	16	26	12
$\text{Cl}^-$	13	13	22	18	26
$\text{NO}_3^-$	< 1	< 1	< 1	13	< 1
$\text{NO}_2^-$	0.05	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
$\text{PO}_4^{3-}$	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
$\text{SO}_3^-$	< 1	< 1	< 1	< 0.5	< 1
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	< 0.5	16	14	11	13
$\text{S}^{2-}$	1.2	1,0	0,5	0,5	3,0
<b>Kationen</b>					
$\text{Ca}^{2+}$	64	67	79	82	65
$\text{Mg}^{2+}$	24	20	27	30	21
$\text{Na}^+$	15	14	21	9.1	51
$\text{K}^+$	2.6	3.0	6.1	1.4	7.9
$\text{NH}_4^+$	0.17	0.13	0.33	0.058	0.45
<b>Elemente</b>					
$\text{O}_2$	1.4	1.6	1.0	4.5	< 0.1
<b>Mn</b>	0.02	0.019	0.081	< 0.005	0.017
<b>Ni</b>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<b>As</b>	< 0.001	< 0.002	< 0.002	< 0.002	< 0.002
<b>Al</b>	0.033	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<b>Sb</b>	< 0.002	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003
<b>B</b>	0.090	0.10	0.13	0.029	0.37
<b>Cu</b>	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
<b>Se</b>	< 0.002	< 0.003	< 0.003	0.0041	< 0.003
<b>Zn</b>	0.011	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<b>Fe</b>	< 0.005	0.025	0.021	< 0.005	0.024

**Tab. 10:** Chemische Parameter verschiedener sulfidhaltiger Quellen.

<b>Andere Parameter</b>	<b>Sippenauer Moor</b> 30.03.1999 (mg/l)	<b>Sippenauer Moor</b> 12.02.2002 (mg/l)	<b>Islinger Mühlbach</b> 12.02.2002 (mg/l)	<b>Irnsing</b> 13.02.2002 (mg/l)	<b>Teugn</b> 12.02.2002 (mg/l)
<b>CO<sub>2</sub>, gelöst. (mg/l)</b>	16	19	32	25	25
<b>CO<sub>2</sub>, zugehörig (mg/l)</b>	17	18	38	32	32
<b>DOC (mg/l)</b>	1.1	0.8	0.5	0.5	1.0
<b>SiO<sub>2</sub> (mg/l)</b>	13	12	9.6	8.7	13
<b>Σ Erdalkalien (mmol/l)</b>	2.58	2.50	3.08	3.27	2.48
<b>Gesamthärte (°dH)</b>	14.5	14.0	17.2	18.3	13.9
<b>Carbonathärte (°dH)</b>	13.3	13.1	18.0	16.3	18.3
<b>Gesamtmineralisation (mg/l)</b>	448	435	564	533	583
<b>Oxidierbarkeit (KMnO<sub>4</sub>-Verbrauch) (mg/l)</b>	4.7	2.5	3.2	4.9	3.3
<b>pH</b>	7.50	7.18	7.18	7.23	7.18
<b>Säurekapazität bis pH 4.3 (mmol/l)</b>	4.75	4.70	6.44	5.82	6.54
<b>Säurekapazität bis pH 8.2 (mmol/l)</b>	0.370	0.42	0.73	0.57	0.56
<b>Leitfähigkeit (mS/m)</b>	53	54.2	68.9	65.5	71.1
<b>Temperatur (°C)</b>	10.9	10.1	10.1	10.6	10.1

**Tab. 11:** Chemisch-physikalische Parameter verschiedener sulfidhaltiger Quellen.

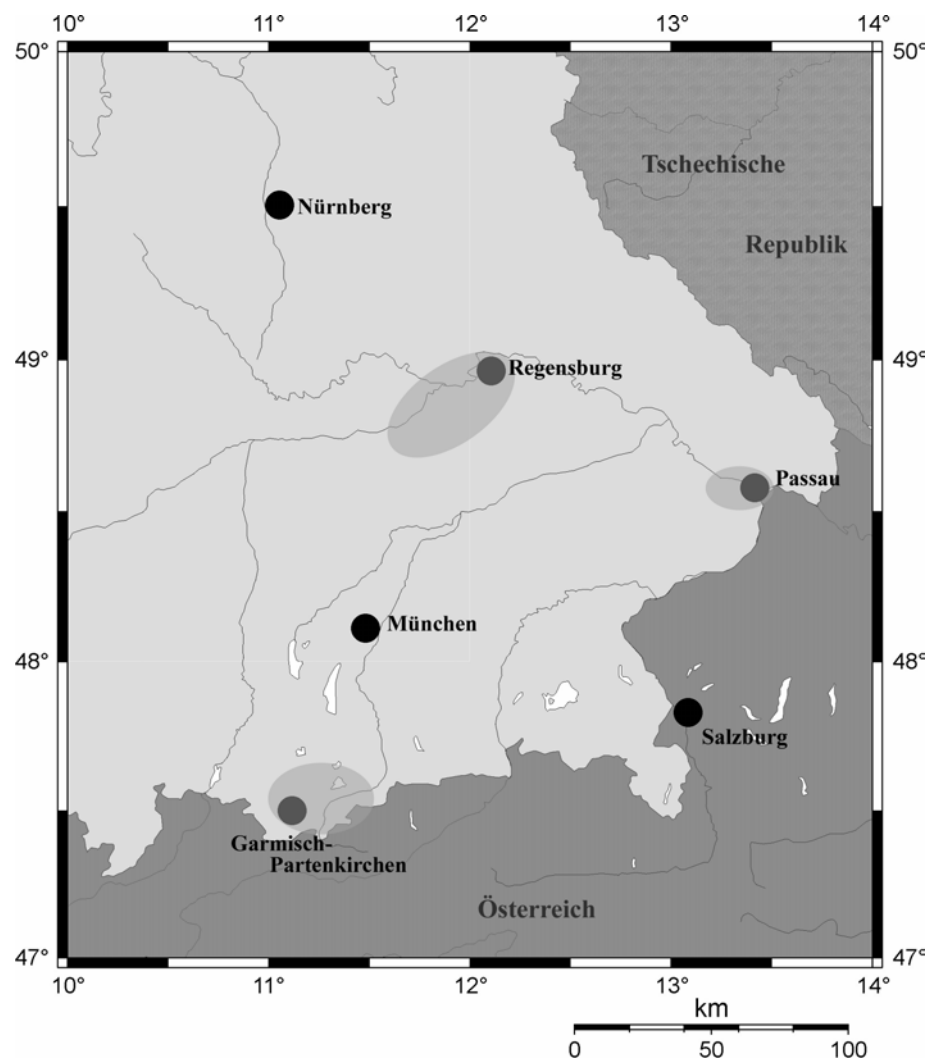
#### 4. Verbreitung der SM1-Archaeen in Schwefelquellen

Schwerpunktmäßig wurden neuartige Archaeen in den Schwefelquellen des Sippenauer Moores untersucht. Um die Verbreitung der dort in den Perlenstrukturen nachgewiesenen SM1-Archaeen oder verwandter Organismen in kalten Schwefelquellen festzustellen, wurde eine Vielzahl schwefelhaltiger Quellen aus verschiedenen Gegenden Bayerns untersucht (Abb. 24). Dabei wurden sowohl Schwefelquellen mit ähnlichem als auch mit unterschiedlichem Chemismus ausgewählt.

Die Analysen zur weiträumigen Verbreitung entsprechender Organismen erfolgten an einer warmen, salinen Schwefelquelle der Türkei, die weiße Beläge und definierte kugelförmige Strukturen enthielt (s. III.4.1.4). Neben der Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung wurden an allen Schwefelquellen auch Messungen der physikalischen und chemischen Parameter durchgeführt.

#### 4.1. Beschreibung der Schwefelquellen

Die untersuchten kalten Schwefelquellen in Bayern lassen sich drei unterschiedlichen Gebieten zuordnen, in welchen auch der größte Teil der in Bayern vorkommenden Schwefelquellen entspringt. Hierbei handelt es sich um den Raum Regensburg, den Raum Passau und den Raum Garmisch-Partenkirchen (Abb. 24). Die räumliche Entfernung der Schwefelquellen des Raumes Regensburg zu den Quellen des Raumes Garmisch-Partenkirchen beträgt 180 km, zu den Quellen des Raumes Passau 100 km. Der Raum Passau ist von Garmisch-Partenkirchen 200 km entfernt.



**Abb. 24:** Karte von Bayern und angrenzenden Regionen ([www.aquarius.geomar.de](http://www.aquarius.geomar.de)). Die dunkleren Bereiche um Regensburg, Passau und Garmisch-Partenkirchen kennzeichnen den jeweiligen Raum, in dem sich die untersuchten Schwefelquellen befinden.

#### 4.1.1. Raum Regensburg

##### 4.1.1.1. Chemisch-physikalische Parameter

Die chemischen und physikalischen Parameter der untersuchten Schwefelquellen im Raum Regensburg wurden wiederholt durch Messungen vor Ort bestimmt. Die Mittelwerte der erhaltenen Daten sind in den Tabellen 12 und 13 wiedergegeben. Diese Parameter sollten in Verbindung mit dem Nachweis von Archaeen grundlegende Informationen über die Lebensbedingungen der kälteliebenden Archaeen in diesen kalten Schwefelquellen liefern.

Während in allen untersuchten Quellen verschiedene Parameter, wie die Wassertemperatur, der pH-Wert oder die Leitfähigkeit, nahezu konstant blieben, unterlagen andere, wie der Sulfid- oder Sauerstoffgehalt, stärkeren Schwankungen. Im Fall der Konzentration gelösten Sauerstoffes lag dies an auftretenden Verwirbelungen, die beispielsweise durch Laub oder Äste verursacht wurden, und am schwankenden Gehalt an Sulfid, das den eingebrachten Sauerstoff reduziert. So schwankte der Sulfidgehalt beispielsweise an der Hauptquelle des Probenahmeortes Str. 1 im Sippenauer Moor von 0,5 mg/l bis über 1 mg/l, wobei eine genauere Bestimmung mit dem Schnelltest nicht möglich war.

Parameter	Sippenauer Moor									
	Hauptquelle Str. 1	Quelle unter Wurzel Str. 1	Quelle I	Quelle II	Quellentopf	Weg	Parkplatz	Holzbrücke	Künstlicher Auslauf	Quell- aufstoß
Quellentyp	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	Überdruck- brunnen	frei auslaufend
Bezeichnung in Abb. 27	A	B	C	D	F	E	H	G	I	K
Temperatur (°C)	11	11	11	11	11	11	12	11	11	11
pH	7,3	7,4	7,3	7,3	7,4	7,3	7,4	7,4	7,3	7,4
S <sup>2-</sup> (mg/l)	0,7 – 1,0	1,0	1,0	0,5	0,3	0,1	0,05	1,0	1,0	1,0
O <sub>2</sub> (mg/l)	1,2	1,0	0,14	0,55	0,2	1,58	2,05	0,31	n.d.	0,29
Leitfähigkeit (µS/cm)	532	533	533	534	535	543	518	533	n.d.	529

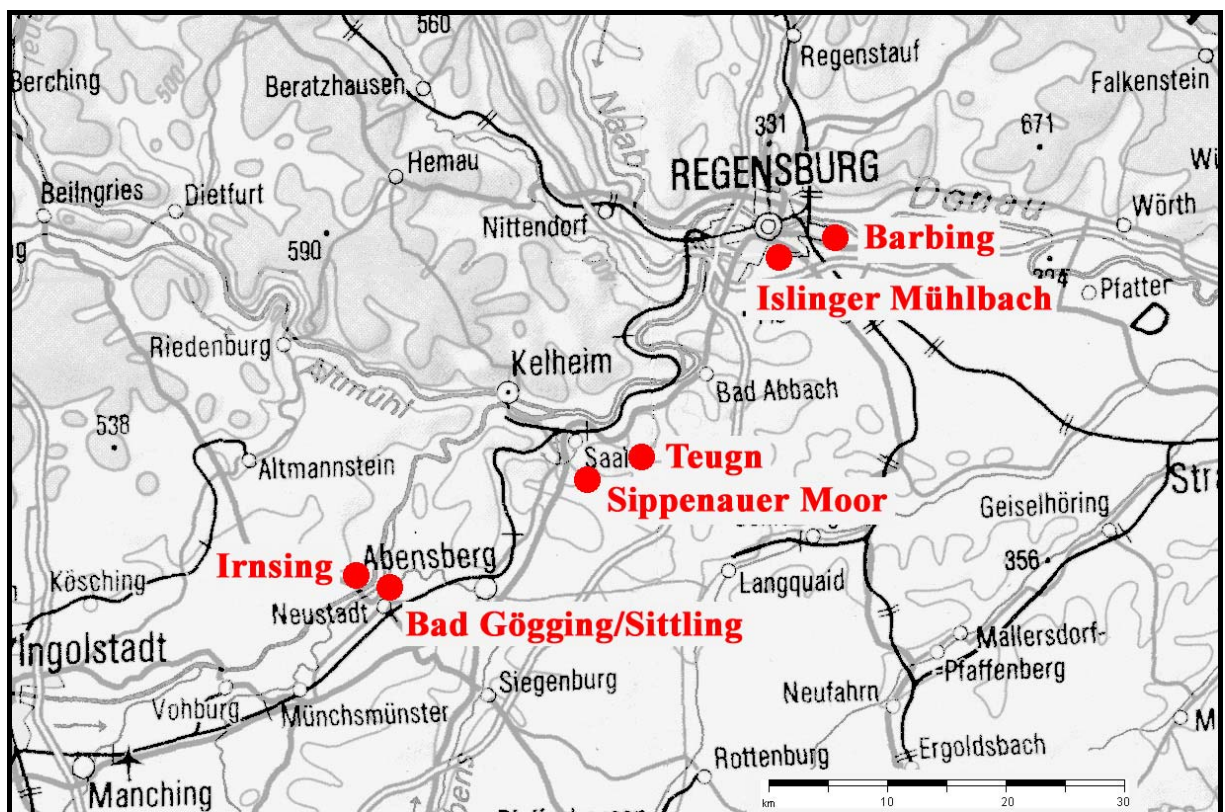
Tab. 12: Chemisch-physikalische Parameter der Schwefelquellen im Sippenauer Moor.

Parameter	Islinger Mühlbach	Bad Gögging Wiesenquelle	Bad Gögging Tiberiusquelle	Bad Gögging Albertusquelle	Sitting	Teugn	Irnsing	Barbing
Quellentyp	gefasst	frei auslaufend	Schachtbrunnen	gefasst	frei auslaufend	frei auslaufend	frei auslaufend	gefasst
Lage	N48°59,140' O12°07,631'	N 48°49,424' O11°46,373'	N 48°49,397' O11°46,535'	N48°49,496' O11°46,651'	N48°50,029' O11°45,873'	N48°54,095' O12°00,963'	N48°49,749' O11°44,600'	N49°00,383' O12°12,673'
Positions- genauigkeit	4 m	4 m	4 m	5 m	5 m	10m	10 m	5 m
Temperatur (°C)	10	13	14	13	11	12	10	16
pH	7,2	7,5	7,5	7,5	7,5	7,3	7,4	7,4
S <sup>2-</sup> (mg/l)	0,5	4	3 - 4	3 - 4	3 - 4	2 - 3	0,3	0,6
O <sub>2</sub> (mg/l)	0,13	3,51	0,31	1,28	0,25	0,77	3,91	0,07
Leitfähigkeit (µS/cm)	685	599	707	656	570	723	644	1884

**Tab. 13:** Chemische und physikalische Parameter weiterer, untersuchter Schwefelquellen im Raum Regensburg.

## 4.1.1.2. Schwefelquellen

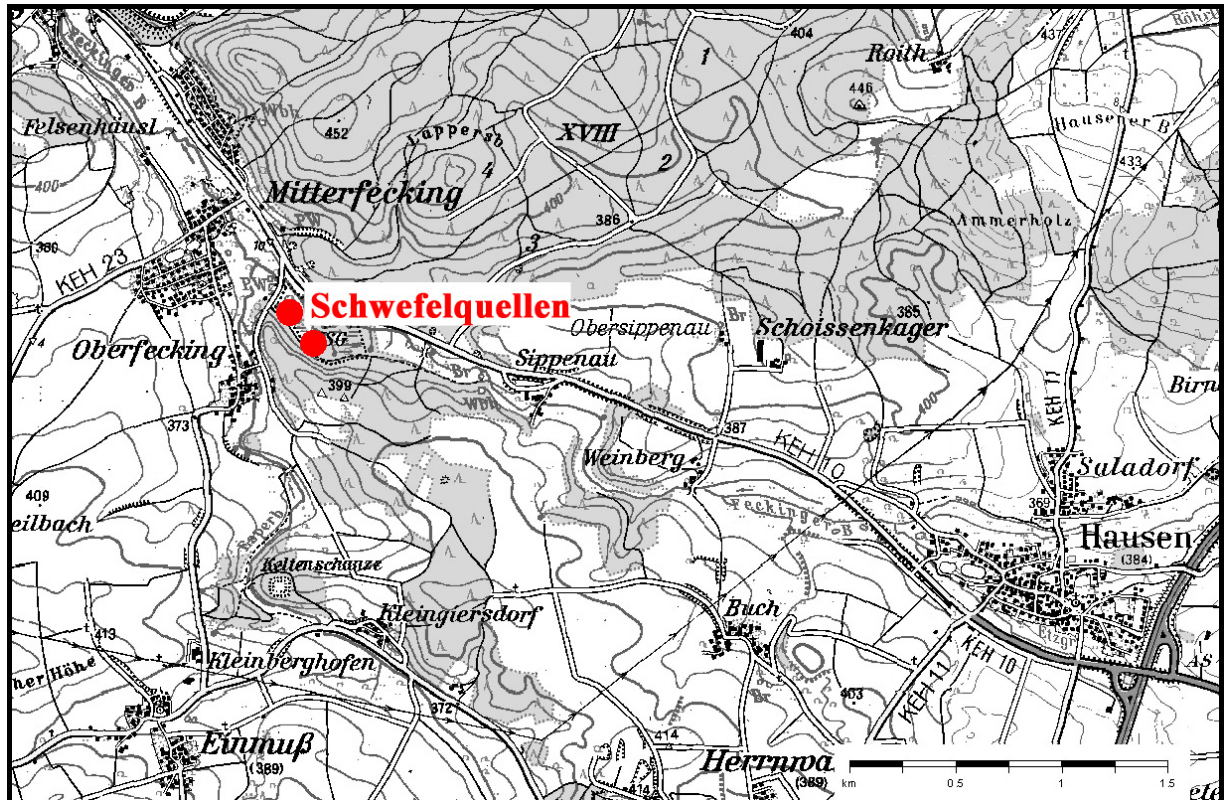
Im Raum Regensburg wurden insgesamt 18 kalte Schwefelquellen aus sechs Orten zwischen Regensburg und Neustadt a.d. Donau näher untersucht (Abb. 25). Zehn sulfidhaltige Quellen wurden im Sippenauer Moor bei Saal a.d. Donau analysiert, um die kleinräumige Verbreitung der SM1-Archaeen und der Perlenketten festzustellen. Das Vorkommen in weiteren Schwefelquellen des Raumes Regensburg wurde an drei Schwefelquellen in Bad Gögging und an jeweils einer am Islinger Mühlbach bei Regensburg, bei Sittling, bei Teugn und nahe Barbing untersucht.



**Abb. 25:** Untersuchte Schwefelquellen im Raum Regensburg (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:1.000.000, verändert).

## 4.1.1.2.1. Sippenauer Moor

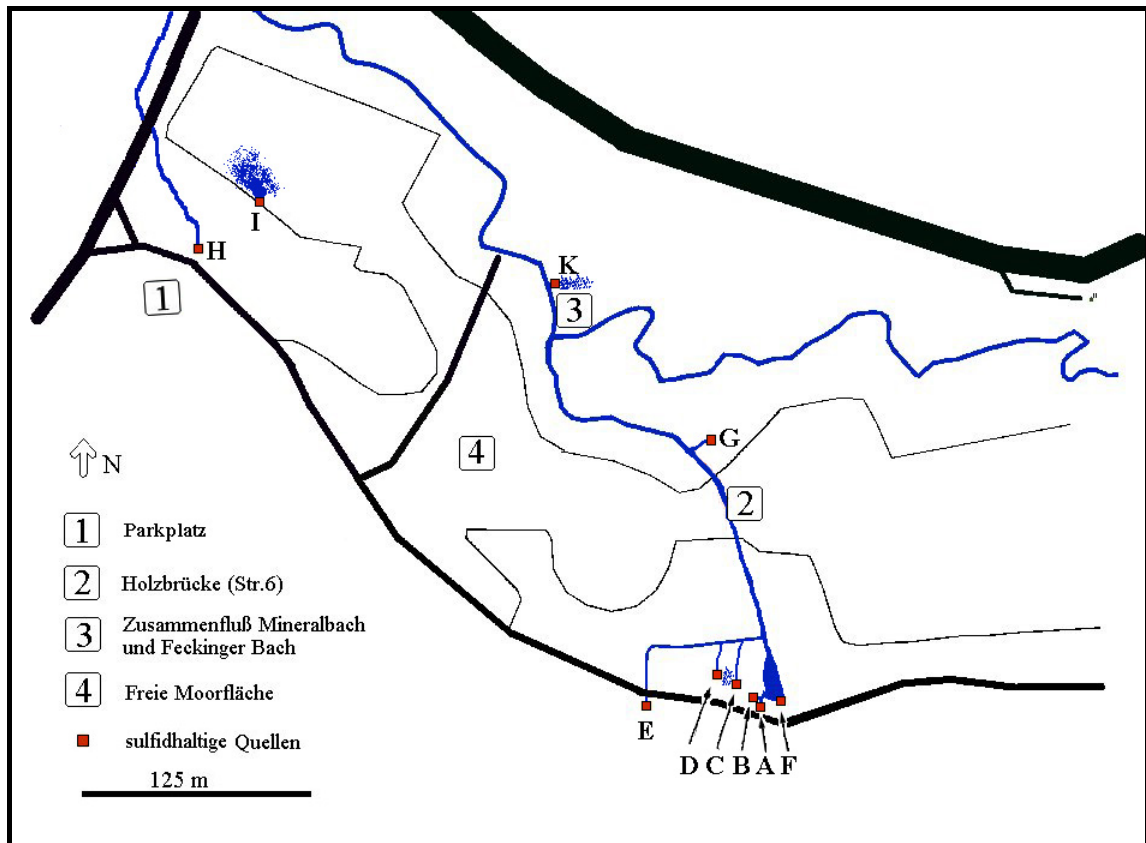
Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf Schwefelquellen des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor, das sich im Landkreis Kelheim zwischen Saal a.d. Donau und Hausen befindet (Abb. 26). Dort entspringen 10 mehr oder weniger ergiebige Schwefelquellen, die an weißen Belägen und dem markanten Geruch nach Sulfid zu erkennen sind (Abb. 27).



**Abb. 26:** Lage des Sippenauer Moores mit Schwefelquellen (TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).

Die Untersuchungen fanden überwiegend am Probenahmeort Str. 1 statt, der sich von der Hauptquelle A (Abb. 27, Abb. 28A) bis zum großen Quelltopf erstreckt. Dabei handelt es sich um einen ungefähr 5 m langen Bachlauf, der an der schwefelhaltigen Hauptquelle A entspringt und in dessen Verlauf die unter einer großen Wurzel aus einer Höhle ausfließende Schwefelquelle B<sub>1</sub> mündet (Abb. 27, Abb. 28B). An der Mündung wird durch eine dritte Schwefelquelle (Quelle B<sub>2</sub>) in 10 cm Tiefe zusätzlich sulfidhaltiges Wasser direkt in den Bachlauf gedrückt. Im Gegensatz zu den Quellen A und B<sub>1</sub>, deren Untergrund mit weißen Biomatten überzogen war, wurde die Austrittsstelle von grün-schwarzen Biomatten fester Konsistenz bedeckt. Die Untersuchung chemisch-physikalischer Parameter dieser Schwefelquelle war jedoch nicht möglich, weil immer eine Vermischung mit dem Wasser des Bachlaufes vorlag.





**Abb. 27:** Lage der Schwefelquellen im Sippenauer Moor (Skizze verändert nach Warneke, 1992<sup>186</sup>).

Der Bachlauf am Probenahmeort Str. 1 besitzt eine hohe Dynamik und enthält zahlreiche Verwirbelungen, verursacht durch den Austritt der Quelle A in ca. 30 cm Höhe, sowie durch im Bachlauf liegende Äste bzw. Steine und daraus resultierende, kleine Wasserfälle. Der gesamte Boden war, verstärkt an Verwirbelungen bzw. kleinen Wasserfällen mit verschieden gefärbten Biomatten belegt. Neben den charakteristischen, weißen Belägen, traten auch grüne, rötliche und schwarze auf. Das Ausmaß dieser Biofilme unterlag starken jahreszeitlichen Schwankungen und reichte von Biomatten, die den gesamten Bachlauf auskleideten bis zu sehr schwachen Belägen, die dann nur an Verwirbelungen makroskopisch zu erkennen waren. Direkt nach dem Austritt der Hauptquelle A konnten weiße, flotierende Streamer mit einer Länge bis zu 30 cm beobachtet werden. Im gesamten Bereich des Probenahmeortes Str. 1 konnten Perlenketten aufgefunden werden, deren Häufigkeit mit dem Ausmaß der Biofilme korrelierte.



**Abb. 28:** Schwefelquellen am Probenahmeort Str. 1 im Sippenauer Moor.  
(A) Übersicht Probenahmeort Str. 1 mit Hauptquelle A, Quelle B<sub>2</sub> (roter Pfeil) und Einmündung der Quelle B<sub>1</sub> (unter Wurzel rechts von B<sub>2</sub>).  
(B) Schwefelquelle B<sub>1</sub>: Blick in die kleine Höhle unter der Wurzel.

Die Schwefelquelle C liegt ungefähr 15 m nordwestlich von der Hauptquelle A entfernt zwischen Sträuchern und mündet nicht in den großen Quelltopf. Aus einem Quellbecken mit ca. 2 m Durchmesser wird sulfidhaltiges Wasser gedrückt, das in einem anschließenden, kleinen Bachlauf unterhalb des großen Quelltopfes in den Mineralbach mündet (Abb. 27, Abb. 29A). Die Quelle wurde häufig von Laub bedeckt, das schwach von weißlichen Biofilmen besiedelt wurde. An Ästen, die in dem Quellbecken lagen, konnte ein grün-schwarzer Belag erkannt werden. Im Verlauf des anschließenden, kleinen Baches traten nach ca. einem Meter und zunehmender Dynamik des Wassers auch starke, weiße Beläge auf, die das Bachbett bis zur Einmündung in den Mineralbach auskleiden. In diesem Bereich konnten auch Perlenketten und flotierende Streamer aufgefunden werden.

Die Quelle D entspringt ca. 5 m westlich von Quelle C unter Laub (Abb. 27, Abb. 29B) und schüttet sehr schwach. Das Wasser fließt in einen kleinen Bach, der von Schwefelquelle E gespeist wird und kurz unterhalb des Quelltopfes in den Mineralbach mündet. Von dem sulfidhaltigen Wasser überspülte Steine und Laub wurden von einem weißen Belag überzogen.





**Abb. 29:** Schwefelquellen C und D im Sippenauer Moor.

(A) Von Laub bedeckter Quelltopf der Quelle C und anschließender Ablauf mit weißen Belägen an den Blättern.

(B) Schwefelquelle D: Das aufliegende Laub ist mit weißen Biomatten überzogen.

Mit der Quelle F, deren Austrittsstelle ca. 8 m östlich von der Hauptquelle A entfernt liegt, mündet eine weitere Schwefelquelle direkt in den großen Quelltopf (Abb. 27, Abb. 30A). Auf Höhe des Wasserspiegels dieses Quelltopfes wird sulfidhaltiges Wasser aus einer kleinen Höhlung herausgedrückt. Die Wassertiefe betrug 2 – 3 cm und der Quellbereich zeichnete sich durch eine sehr geringe Dynamik aus. Der Untergrund, sowie Äste, Blätter und Gräser, die im Wasser lagen wurden teilweise von weißlich-grauen Biomatten überzogen. Streamer oder Perlenketten wurden in diesem Bereich nicht aufgefunden.

Eine weitere Schwefelquelle im Sippenauer Moor befindet sich direkt rechts des Weges vom Parkplatz zum großen Quelltopf (Abb. 27, Abb. 30B). Diese Quelle E schüttet in einen künstlich gestauten, kleinen Tümpel, der über ein kurzes Regenrohr (Ø 13 cm) über den Gehweg in die Moorfläche abläuft und letztlich in den Mineralbach mündet. Sowohl innerhalb des Quellbeckens als auch im Ablauf nach dem Regenrohr waren bräunlich-weiße Streamer und Biofilme sichtbar, die Steine und Laub überzogen. Die Schüttung der Quelle erlosch während des Beobachtungszeitraumes immer wieder für einige Zeit.



**Abb. 30:** Schwefelquellen E und F im Sippenauer Moor.

- (A) Quelle F mit weißen Belägen an Blättern im Auslauf, der in den großen Quelltopf mündet.
- (B) Becken der Quelle E, die sich rechts des Weges vom Parkplatz zum großen Quelltopf befindet. An stärker verwirbelten Stellen waren weiße Biofilme erkennbar.

Im den Mineralbach fließt ca. 100 m unterhalb der Hauptquelle A eine weitere Schwefelquelle. Ihr Ursprung liegt im Wald östlich des Mineralbaches, in den das Wasser über einen ca. 4 m langen Zufluss abgeleitet wird (Abb. 27, Abb. 31A). Diese Quelle G wurde von Laub und kleinen Ästen bedeckt, die mit weißen Biofilmen überzogen waren. An der Mündung in den Mineralbach konnten auch bräunlich-weiße Streamer bis zu einer Länge von 15 cm aufgefunden werden.

Die Schwefelquelle H des Sippenauer Moores tritt unterhalb des Parkplatzes direkt benachbart zu einer Süßwasserquelle zu Tage (Abb. 27, Abb. 31B). Ähnlich wie Quelle E schüttet sie in einen künstlich gestauten, kleinen Tümpel, dessen Abfluss ein kurzes Regenrohr darstellt. Gleich nach dem Regenrohr vereinigt sich das Wasser der Schwefelquelle mit dem der benachbarten Süßwasserquelle und bildet einen kleinen Bach, der in den Feckinger Bach mündet. Der typische Charakter einer Schwefelquelle mit ausgeprägten, weißen Belägen war allerdings nicht immer zu erkennen.

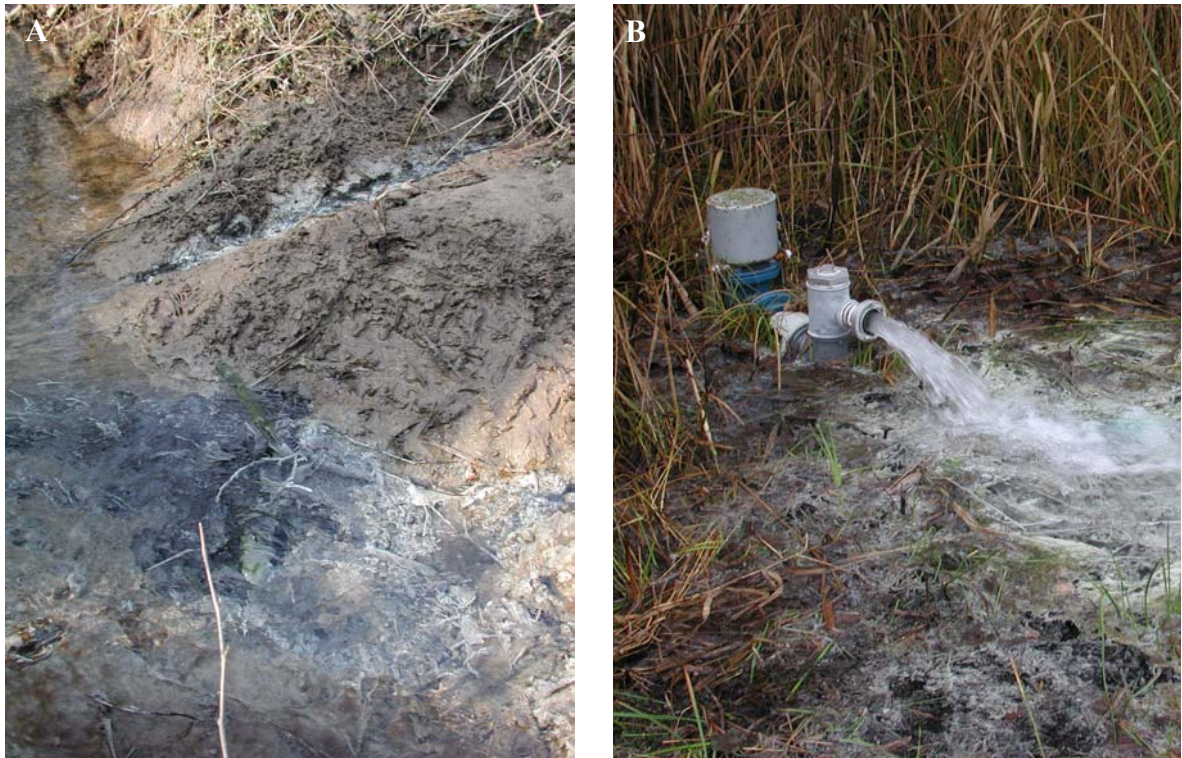




**Abb. 31:** Schwefelquellen G und H im Sippenauer Moor.

- (A) Von Laub bedeckter Quelltopf der Quelle G, teils mit weißen Biomatten an den Blättern.
- (B) Quellbecken mit weißen Belägen der Schwefelquelle H (roter Pfeil), das nur durch eine kleine Mauer von der benachbarten Süßwasserquelle getrennt ist.

Auf dem gegenüberliegenden Ufer des Feckinger Baches tritt eine weitere Schwefelquelle des Sippenauer Moores direkt neben dem Bachlauf zu Tage. Das Wasser dieser Quelle K (Abb. 27, Abb. 32A) wird aus einem Loch ( $\varnothing \sim 30$  cm) nach oben gedrückt und fließt ohne Verwirbelungen in den Feckinger Bach. Allerdings konnten nur am Rand des Quellaustritts weiße Beläge festgestellt werden, obwohl die Quelle K in einem Quellbereich liegt, in dem an vielen Stellen das Laub mit einem weißen Belag überzogen war. An diesen Stellen mit weißem Belag war die Schüttung des sulfidhaltigen Wassers allerdings so schwach, dass kein abfließendes Wasser festgestellt werden konnte. Streamer mit Verdickungen oder Perlenketten konnten in diesem Quellbereich nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 32:** Schwefelquellen I und K im Sippenauer Moor.

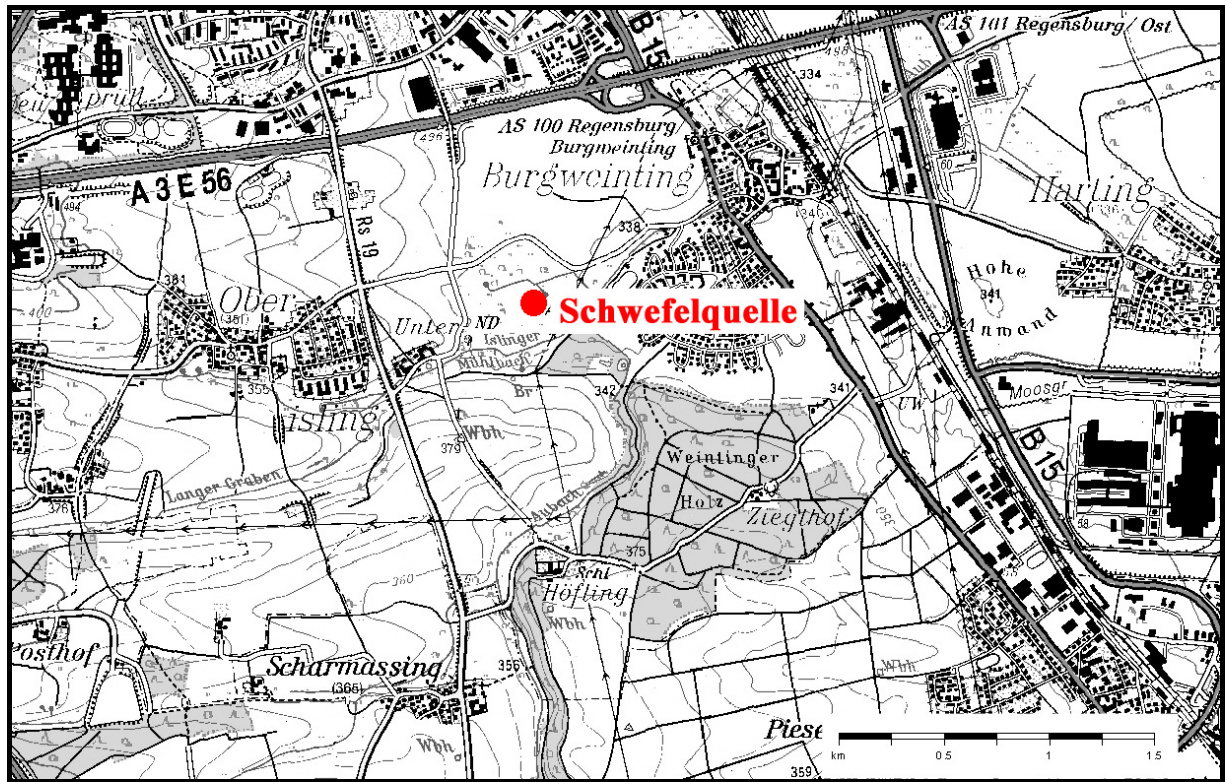
- (A) Austritt der stark schüttenden Quelle K. Um das Quelltloch sind weiße Beläge erkennbar.
- (B) Schwefelquelle I: Auslauf der künstlichen Schwefelquelle zur Stützung des Wasserspiegels im Sippenauer Moor mit weißen Biomatten an überspülten Gräsern.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Schwefelquellen des Sippenauer Moores handelt es sich bei der sulfidhaltigen Quelle I (Abb. 27, Abb. 32B) um einen künstlichen Wasseraustritt. Dieser wurde im Rahmen der Ausgleichsmaßnahmen im Jahr 2002 geschaffen, um den Wasserspiegel des Moores zu heben (s. Einleitung). Dabei handelt es sich um den Auslauf eines Überdruckbrunnen, der sulfidhaltiges Wasser aus einer Tiefe von bis zu 10 Metern an die Oberfläche bringt. Die Bohrung, aus der das Wasser entnommen wird befindet sich direkt am Fußweg vom Parkplatz zum großen Quelltopf. Der Auslauf wurde im Winter abgebaut. Das austretende, sulfidhaltige Wasser lief in die freie Moorfläche ab und überspülte Gras, das mit weißen Belägen überzogen war. In diesem Bereich konnten auch bräunlich-weiße Streamer mit einer Länge bis zu 15 cm aufgefunden werden.



## 4.1.1.2.2. Islinger Mühlbach

Die Schwefelquelle am Islinger Mühlbach liegt südlich von Regensburg zwischen dem Stadtteil Burgweinting und Oberisling (Abb. 33).



**Abb. 33:** Lage der Schwefelquelle am Islinger Mühlbach bei Regensburg, Burgweinting (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).

Dort tritt das sulfidhaltige Wasser unter Bäumen aus einer gebohrten Quelle aus, die mit einem Metallrohr ( $\varnothing$  ca. 20 cm) gefasst ist (Abb. 34). Aufzeichnungen über Zeitpunkt oder Tiefe der Bohrung konnten bei den zuständigen Behörden nicht aufgefunden werden, was darauf hindeutet, dass es sich um eine ungenehmigte Bohrung handelt. Der durch den Quellaustritt entstehende Bach mündet nach Vereinigung mit einem weiteren Quellbach in den Aubach.

Das Rohr, darin versenkte Steine und der anschließende Bachlauf waren mit einem schwarzgrünen Belag überzogen. Im Randbereich traten weiße Beläge auf, die nach zunehmender Dynamik des Wassers den gesamten Bachlauf auskleideten und ab 0,5 m bis ca. 10 m nach dem Quellaustritt zu finden waren. Dort konnten auch weiße Streamer und Perlenketten mit einer Länge bis zu 30 cm nachgewiesen werden, deren Biomasse allerdings zeitlichen Schwankungen unterworfen war.



**Abb. 34:** Schwefelquelle am Islinger Mühlbach mit grün-schwarzen und weißen Belägen.  
A) Übersicht der Quelle mit anschließendem Bachlauf.  
B) Nahaufnahme des gefassten Quellaustritts (roter Pfeil zeigt auf Eisenrohr).

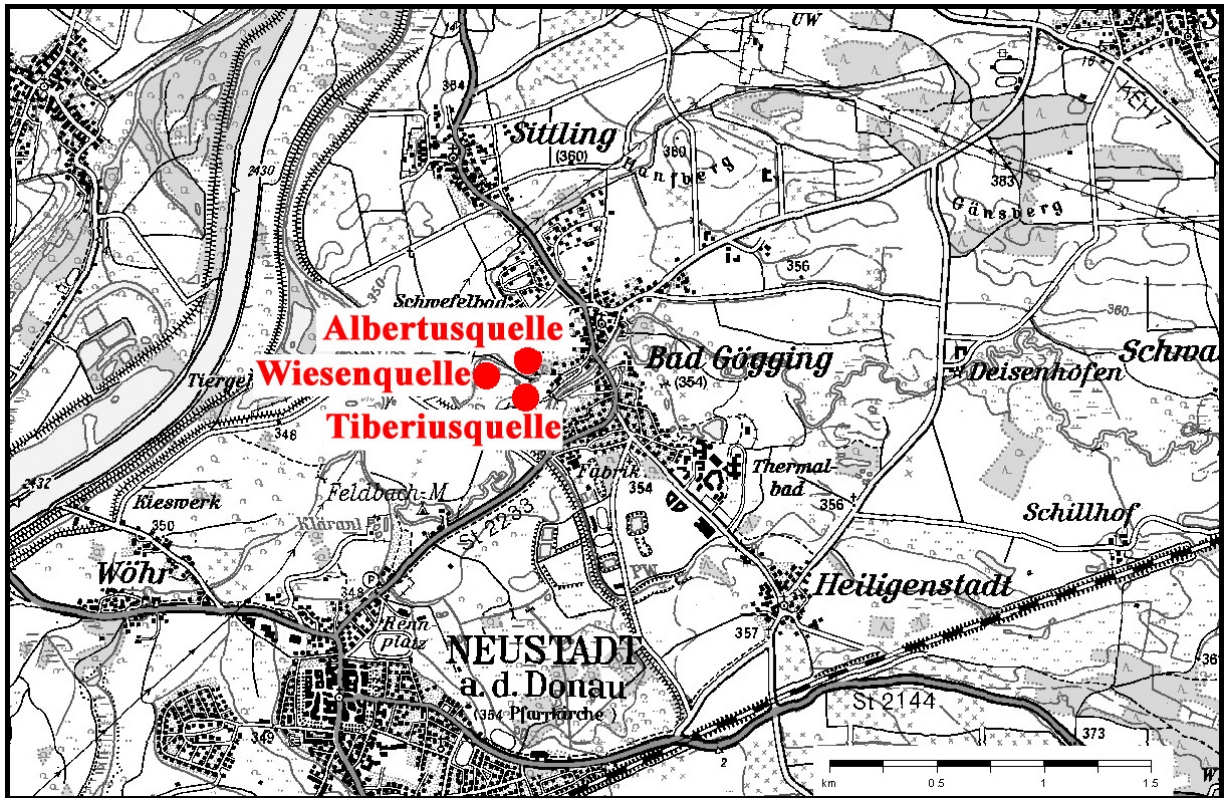
#### 4.1.1.2.3. Bad Gögging

In Bad Gögging wurden drei der insgesamt zehn gebohrten oder natürlichen Schwefelquellen näher untersucht (Zitat Quellenkarte Prospekt). Sie befinden sich allesamt westlich von Bad Gögging nahe des Römerbades und entspringen entweder direkt im oder nahe beim Kurpark (Abb. 35).

Die im Kurpark gelegene Albertusquelle wurde gebohrt und fördert in ein Brunnenhaus. Das Wasser läuft aus dem Kurhaus in ein ca. 1,5 m langes Becken, das unterirdisch abfließt und nach ca. 20 m in einen offenen Graben mündet (Abb. 36A). Die Wände des Beckens und des Grabens auf einer Länge von 50 m waren mit weißen und grünlichen Belägen überzogen. An Blättern und Ästen konnten auch weiße Streamer bis zu einer Länge von 20 cm beobachtet werden. Die Ausprägung dieser weißen Biofilme war an Stellen mit erhöhter Strömung verstärkt, unterlag aber insgesamt starken zeitlichen Schwankungen. Der Bachlauf mündet nach ca. 500 m in den „Alten Stinker“, einem größeren Wasserlauf, der in die Donau abfließt. Als Tiberiusquelle wird ein Schachtbrunnen bezeichnet, der im Schatten einer kleinen Baumgruppe ein kleines Betonbecken speist, das mit weißen und grünen Belägen ausgekleidet war (Abb. 36C und D). Der verrohrte Abfluss verläuft unter einer Wiese bis er



nach ca. 80 m in den Bach mündet, der von der Albertusquelle gespeist wird. Der Eintritt erfolgt über einen kleinen Wasserfall, was starke Verwirbelungen im Bachbett verursachte. An Schilf und Steinen waren im Mündungsbereich weiße Beläge und Filamente bis zu einer Länge von 20 cm zu beobachten, die noch bis 40 m nach dem Zusammenfluss aufgefunden werden konnten.



**Abb. 35:** Lage der untersuchten Schwefelquellen in Bad Gögging (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).

Im Gegensatz zu den beiden oben beschriebenen, gebohrten Quellen handelt es sich bei der dritten untersuchten sulfidischen Quelle um eine frei auslaufende, natürliche Quelle, die durch einen Betonring gefasst wurde (Abb. 36B). Der Ablauf des entstehenden Baches war bis ca. 50 m nach dem Quellaustritt durch weiße Beläge und Streamer mit einer Länge von 10 cm an Steinen und Schilf gekennzeichnet, die an Wasserverwirbelungen verstärkt zu finden waren. Weiße Beläge aus den drei Quellbecken und den anschließenden Bachläufen wurden näher untersucht.





**Abb. 36:** Die untersuchten Schwefelquellen in Bad Gögging mit grün-schwarzen und weißen Belägen.

A) Durch Albertusquelle gespeister schwefelhaltiger Bachlauf.

B) Wiesenquelle mit grün-schwarzen und weißen Belägen.

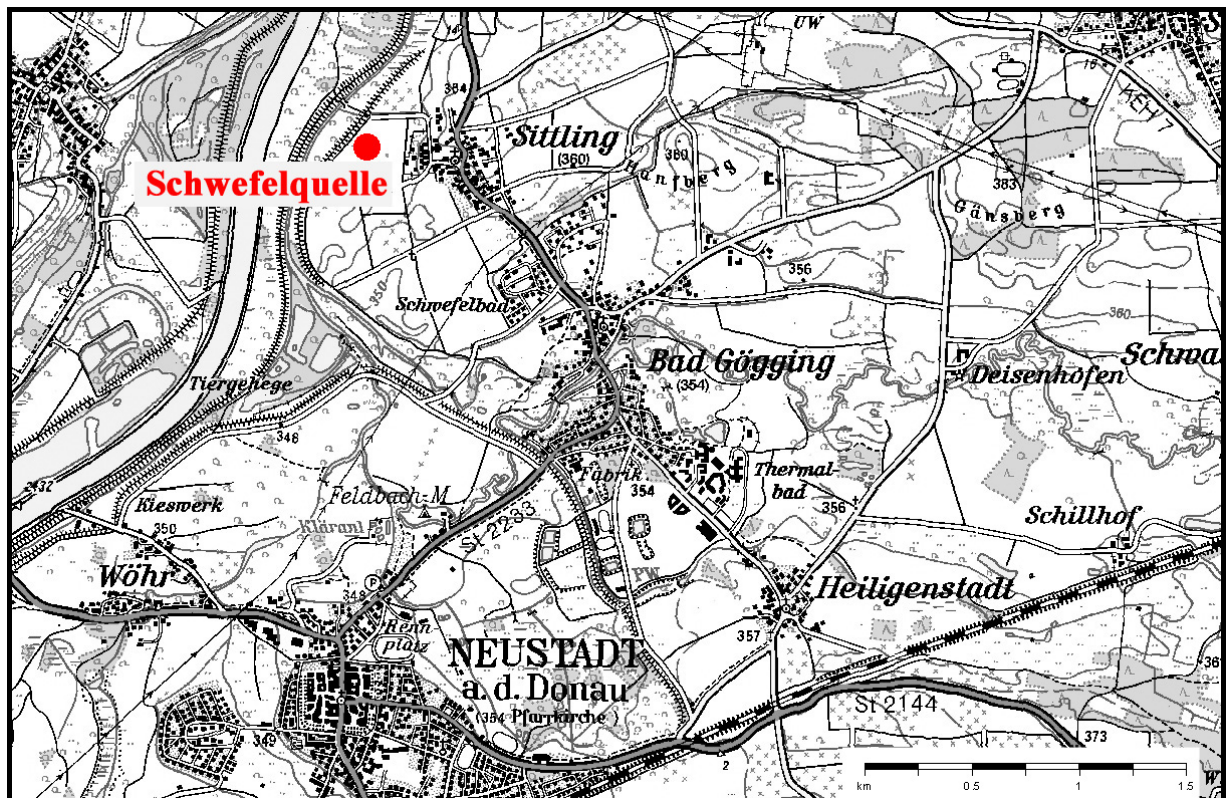
C) Schachtbrunnen Tiberiusquelle mit Quellbecken.

D) Nahaufnahme des gefassten Quellaustritts der Tiberiusquelle.



## 4.1.1.2.4. Sittling

Die Schwefelquelle in Sittling liegt ungefähr 1 km Luftlinie von den untersuchten Quellen in Bad Gögging entfernt und entspringt zwischen bewirtschafteten Feldern (Abb. 37). Der anschließende, ca. 50 m lange Quellbach fließt in einem Graben mit einer Tiefe von ca. 1 m, der von Schilf umgeben ist (Abb. 38). Der Boden, sowie im Bachlauf liegendes Schilf und Gras, waren mit weißen und grün-schwarzen Belägen überzogen, wobei die weißen Biofilme verstärkt an Stellen mit stärkeren Verwirbelungen des Wassers auftraten. An diesen Stellen konnten auch Streamer mit einer Länge bis zu 10 cm beobachtet werden. Diese Streamer, sowie die weißen Beläge, die bis zu 20 m nach der Quelle noch zu finden waren, wurden näher untersucht.



**Abb. 37:** Lage der Schwefelquelle bei Sittling (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).

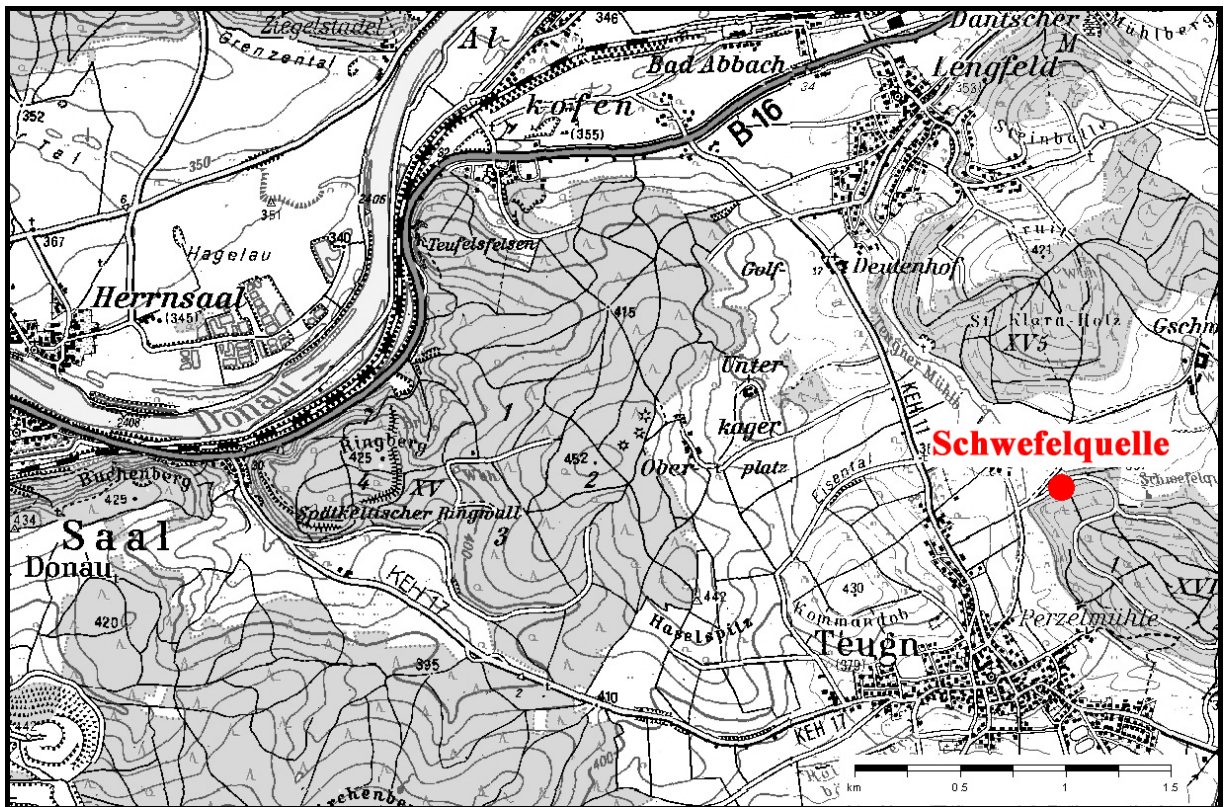


**Abb. 38:** Schwefelquelle bei Sittling.  
(A) Überblick: Roter Pfeil deutet auf Ursprung der Quelle.  
(B) Detail des Bachlaufs mit weißen Belägen. Maßstab: 10 cm

#### 4.1.1.2.5. Teugn

Eine weitere Schwefelquelle im Raum Regensburg liegt bei Teugn in 6 km Entfernung vom Sippenauer Moor. Sie entspringt nordöstlich von Teugn hinter einem Spielplatz direkt am Fuße eines Waldrains (Abb. 39, Abb. 40). Der angrenzende Quellbach mündet nach einem Meter in einen feuchten Graben, der am Rand einer Wiese verläuft. Wegen der umgebenden Bäume enthielt der Bachlauf viele Zweige und Blätter, die verstärkt an Wasserverwirbelungen mit einem weißen Belag überzogen waren. Streamer mit einer Länge bis zu 5 cm konnten an der Einmündung des Quellauftritts in den Graben beobachtet werden. Die weißen Biomatten bedeckten den gesamten Untergrund der Quelle und des Quellbaches bis zu einer Entfernung von 20 m. Die Untersuchungen fanden an den weißen Biofilmen des Bachlaufs statt.





**Abb. 39:** Lage der Schwefelquelle bei Teugn (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).

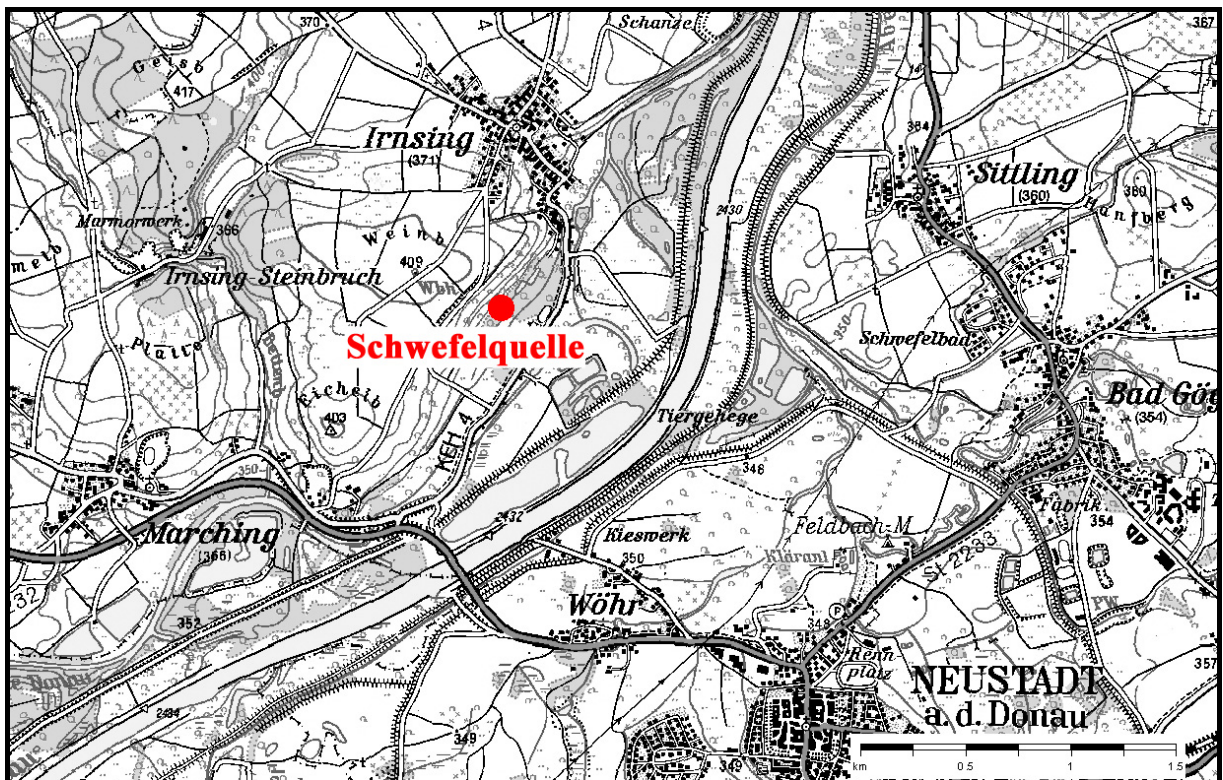


**Abb. 40:** Schwefelquelle bei Teugn mit weißen Belägen.



## 4.1.1.2.6. Irnsing

Die Schwefelquelle bei Irnsing liegt an zwei Teichen in einem kleinen Waldstück ca. 2,5 km von den untersuchten Quellen in Bad Gögging entfernt (Abb. 41). Ihr Ursprung befindet sich am Fuße eines Hügels ungefähr 1,5 m von einem Fischweiher entfernt, den sie auch speist. Die Schüttung der Quelle erfolgt ohne starke Verwirbelungen in ein Becken, das durch den künstlichen Aufstau mit einem Holzbrett direkt vor dem Zufluss zum Weiher entsteht (Abb. 42). Dieses Brett enthält eine Aussparung von 20 cm, durch die das Wasser über einen kleinen Wasserfall direkt in den Weiher abfließt. An diesem Holzbrett, im Weiher unterhalb des Wasserfalles, am Rand des künstlichen Beckens, sowie direkt am Quellaustritt werden ins Wasser ragende Äste, Wurzeln und auch der Boden selbst von weißen Biomatten überzogen. Flotierende, weiße und grünlich-weiße Streamer bis zu einer Länge von 30 cm konnten hauptsächlich an stärker durchströmten Bereichen nach dem Wasserfall beobachtet werden. Die beschriebenen Biofilme wurden näher untersucht.



**Abb. 41:** Lage der Schwefelquelle bei Irnsing (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).

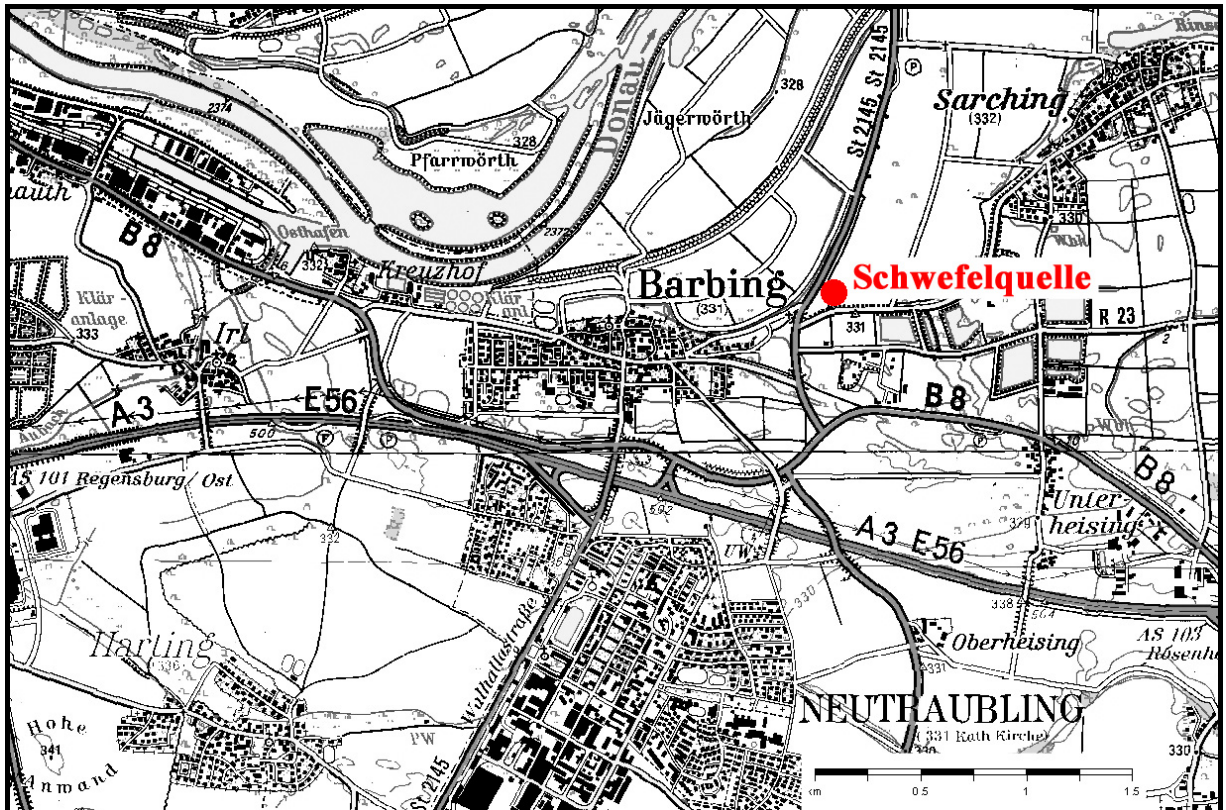


**Abb. 42:**  
Schwefelquelle bei Irnsing mit weißen  
Belägen.

#### 4.1.1.2.7. Barbing

Die gebohrte Schwefelquelle ist westlich von Barbing gelegen und von der Straße aus sichtbar (Abb. 43, Abb. 44). Der Quelltopf besteht aus einem Metallzylinder mit einem Durchmesser von ca. 80 cm. Daraus läuft das Wasser über ein Metallrohr in einen Graben ab, der durch Algen überwachsen war. An diesem Metallrohr sowie im Graben am Zufluss und die folgenden 10 m unter den Algen konnten weiße Beläge und flotierende Filamente bis zu einer Länge von 10 cm - teilweise mit kugelartigen Verdickungen - nachgewiesen werden.





**Abb. 43:** Lage der Schwefelquelle bei Barbing (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).



**Abb. 44:** Quellfassung der gebohrten Schwefelquelle bei Barbing. Am Ausfluss sind weiße Beläge erkennbar.



## 4.1.2. Raum Passau

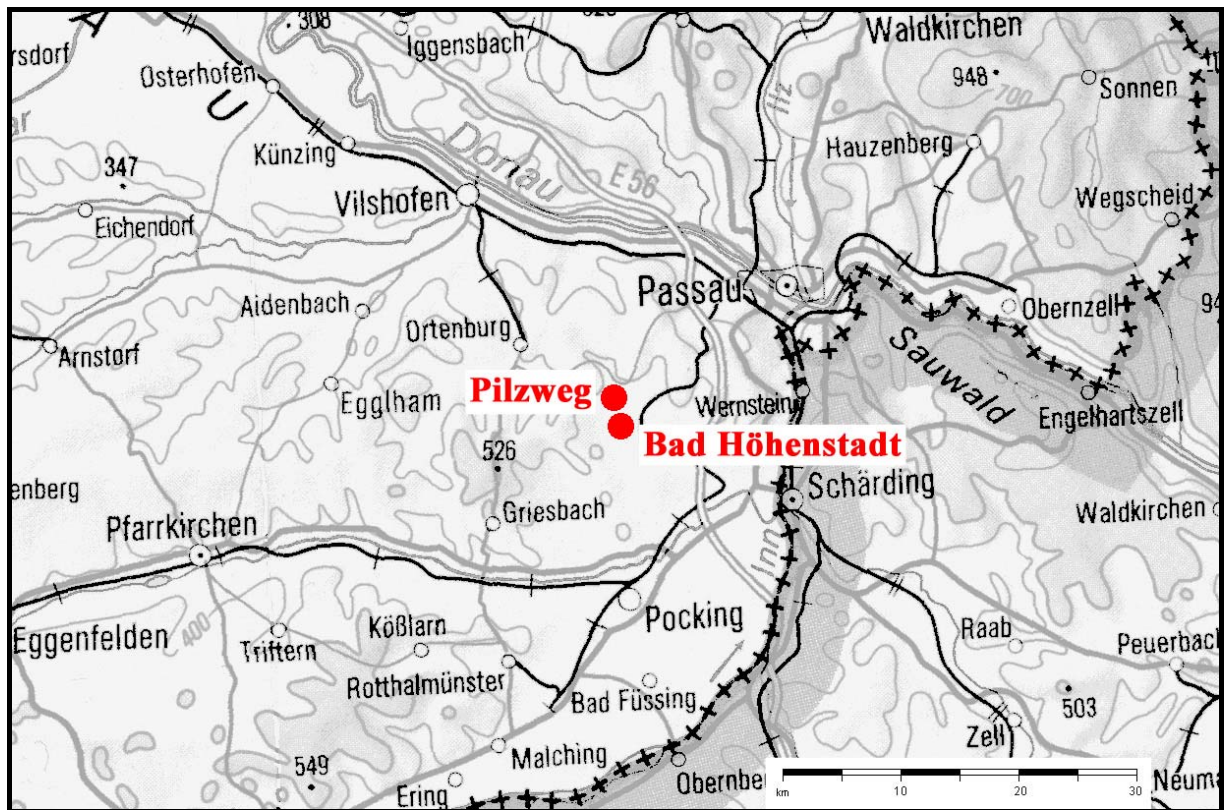
## 4.1.2.1. Chemisch-physikalische Parameter

Parameter	Bad Höhenstadt	Pilzweg
Quellentyp	gefasst	Bohrung gefasst
Lage	N48°29,953' O13°19,151'	N48°30,642' O13°18,074'
Positionsgenauigkeit	10 m	5 m
Temperatur (°C)	10	10
pH	7,2	7,4
S <sup>2-</sup> (mg/l)	1-2	1,0
O <sub>2</sub> (mg/l)	3,76	4,59
Leitfähigkeit (µS/cm)	769	645

**Tab. 14:** Chemisch-physikalische Parameter der untersuchten Schwefelquellen im Raum Passau.

## 4.1.2.2. Schwefelquellen

Im Raum Passau werden eine Reihe von Schwefelquellen zu Heilzwecken genutzt. Zwei frei zugängliche sulfidhaltige Quellen (Bad Höhenstadt, Pilzweg) wurden auf ihre mikrobielle Zusammensetzung näher untersucht (Abb. 45).



**Abb. 45:** Untersuchte Schwefelquellen im Raum Passau (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:1.000.000, verändert).

## 4.1.2.2.1. Bad Höhenstadt

Die Schwefelquelle in Bad Höhenstadt liegt östlich des Kurhauses an einer Böschung in einem kleinen Waldstück direkt unterhalb der Strasse (Abb. 46). Die Brunnenfassung besteht aus einem verschlossenen Betonbecken, dessen Wasser über ein Metallrohr abfließt und einen stark durchströmten Quellbach speist (Abb. 47). Die Steine des Bachgrundes, sowie von Schwefelwasser überspülte Äste und Blätter waren mit weißen Belägen überzogen. An weniger stark verwirbelten Bereichen konnten Filamente mit einer Länge bis zu 5 cm nachgewiesen werden, die teilweise blasenartige Verdickungen aufwiesen.



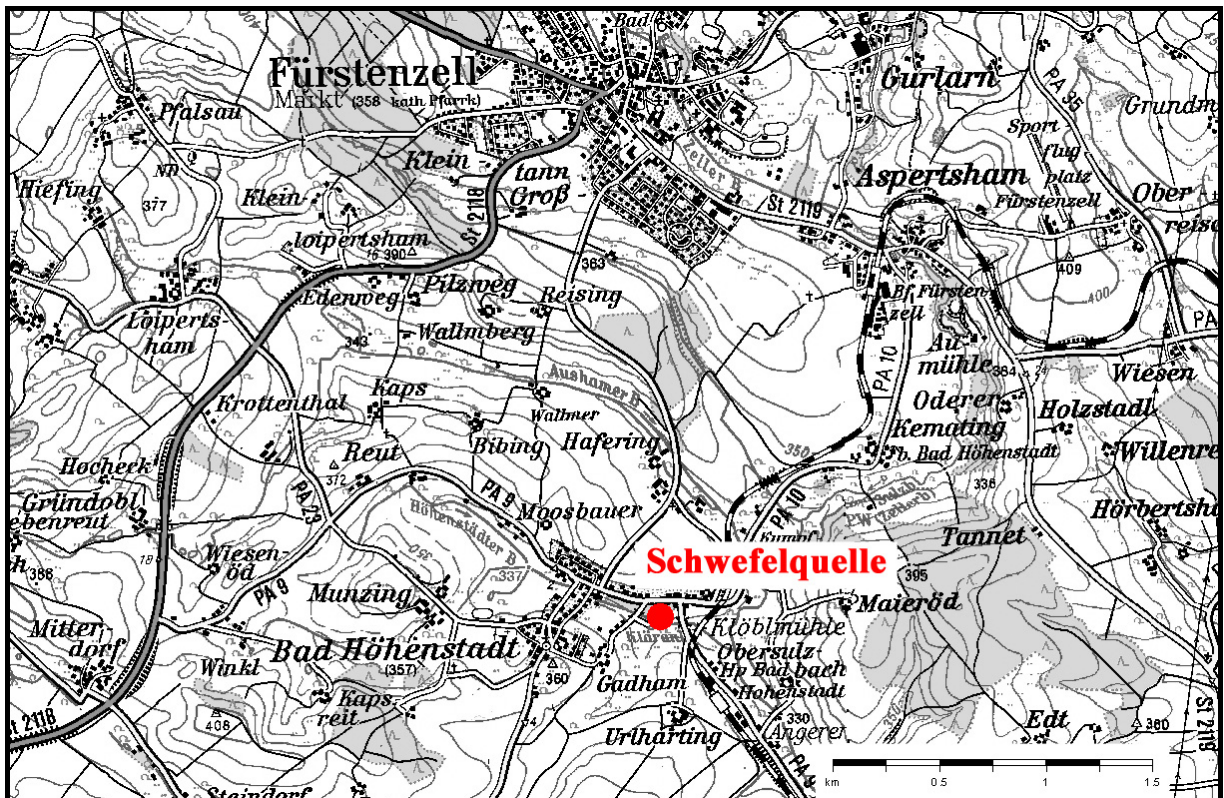


Abb. 46: Lage der Schwefelquelle in Bad Höhenstadt (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).



Abb. 47: Brunnenfassung der Schwefelquelle in Bad Höhenstadt. Im Bachlauf unterhalb des Zuflusses sind weiße Beläge erkennbar.



## 4.1.2.2.2. Pilzweg

Unterhalb des Kurhauses in Pilzweg entspringt die gebohrte Schwefelquelle (Abb. 48). Das sulfidhaltige Wasser wird durch ein Metallrohr nach oben gedrückt und ergießt sich aus einem Meter Höhe in einen Steintrog (Abb. 49A). Dessen Wandung und im Trog liegende Äste waren mit weißen und grünlich-weißen Belägen überzogen. Weiße, flotierende Streamer konnten bis zu einer Länge von 40 cm nachgewiesen werden und enthielten unregelmäßige Verdickungen (Abb. 49B). Am Rand des Beckens wurden zudem grüne, flotierende Fäden bis zu einer Länge von 10 cm gefunden, die aus fädigen Algen bestanden, woran teilweise bauschige, weiße Kugeln mit einem Durchmesser bis zu 4 mm erkannt werden konnten (Abb. 64). Weiße Biomatten überziehen auch die Böschung, über die das aus dem Steintrog abfließende Wasser in einen angrenzenden Bach strömt. Im Bach konnten nur direkt an der Eintrittsstelle weiße, flotierende Streamer bis 10 cm Länge an Grashalmen oder kleinen Ästen festgestellt werden.

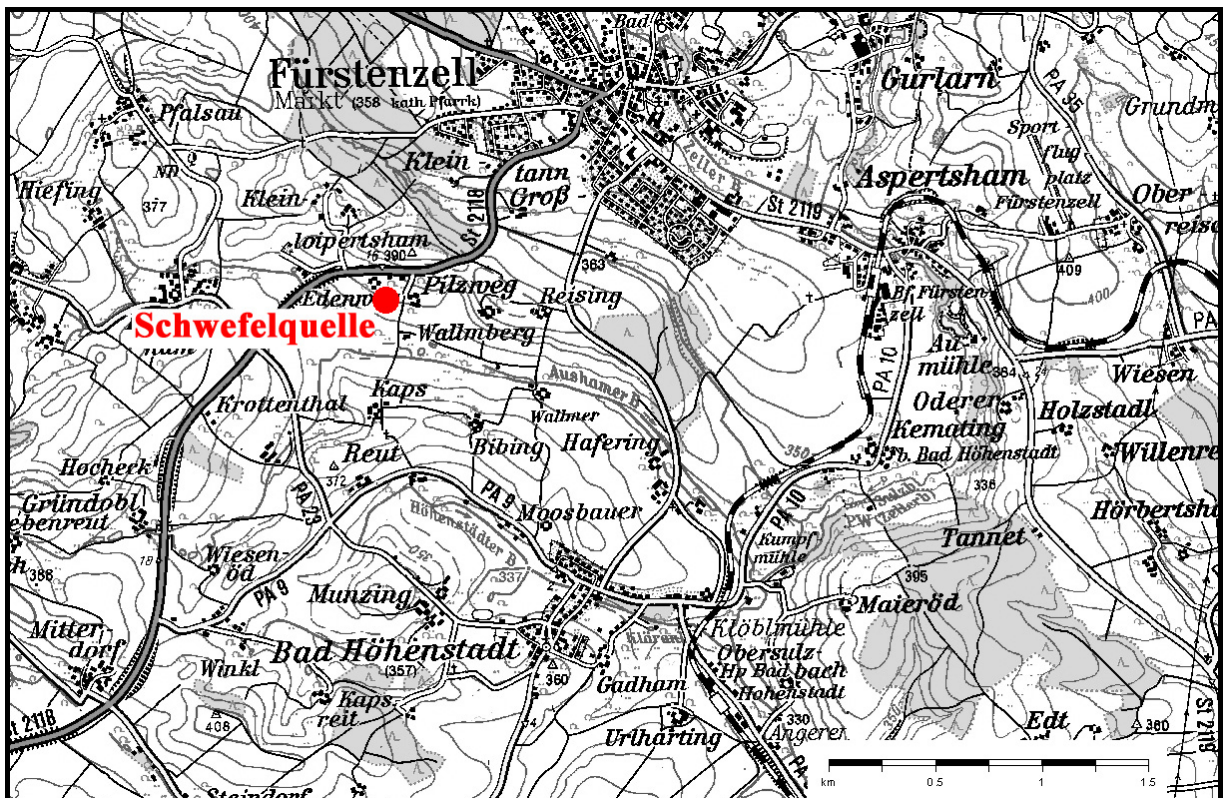


Abb. 48: Lage der Schwefelquelle in Pilzweg (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).





**Abb. 49:** Schwefelquelle bei Pilzweg.

A) Übersicht der Quelle mit Steintrog.

B) Nahaufnahme der weißen und grünen Streamer im Steintrog. Maßstab: 10 cm

## 4.1.3. Raum Garmisch-Partenkirchen

## 4.1.3.1. Chemisch-physikalische Parameter

Parameter	Hartsteinwerke b. Eschenlohe	Eschenlohe	Stinkergraben	Kochelberg
Quellentyp	frei auslaufend	gefasst	frei auslaufend	gefasst
Lage	N47°37,802' O11°08,750'	N47°35,591' O11°10,790'	n.d.	N47°28,557' O11°06,459'
Positions- genauigkeit	10 m	12 m	n.d.	7 m
Temperatur (°C)	8	9	7	6
pH	7,4	7,3	7,5	8,5
S <sup>2-</sup> (mg/l)	0,5	0,1	4-5	1,0
Leitfähigkeit (µS/cm)	728	1064	n.d.	n.d.

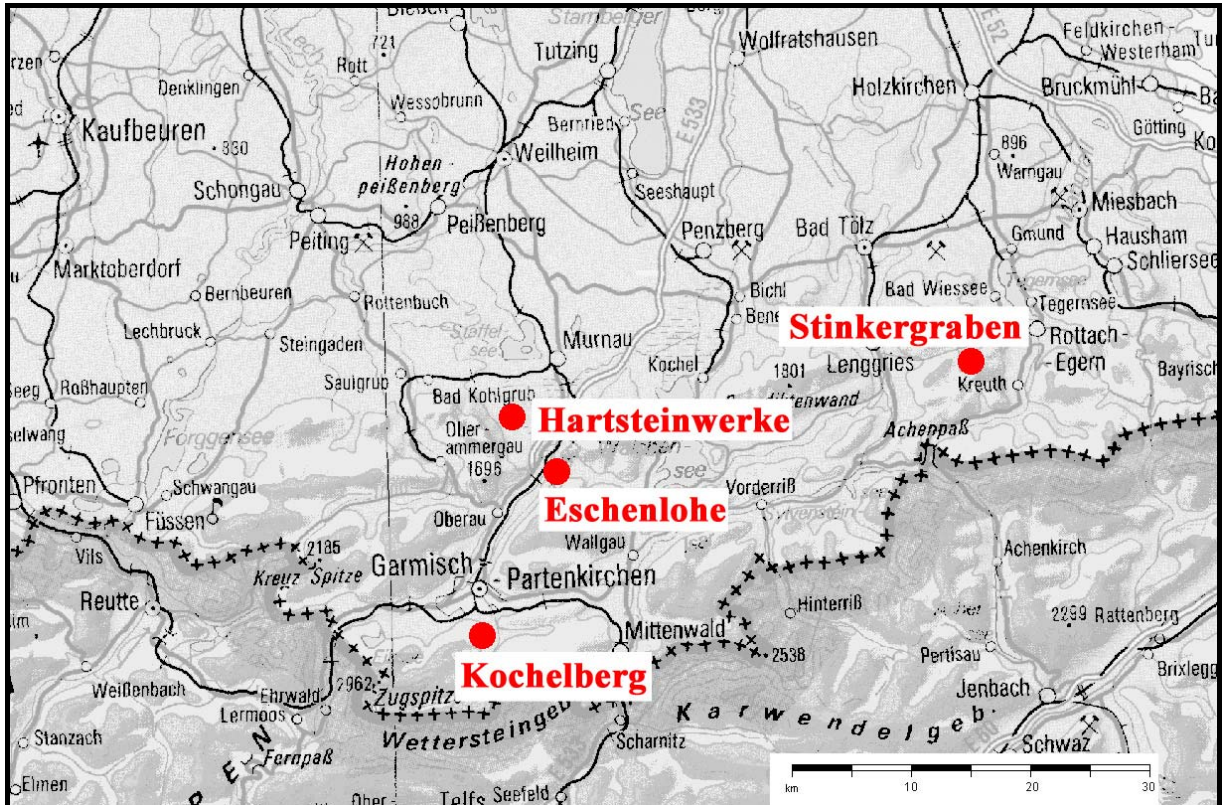
n.d. nicht bestimmt

**Tab. 15:** Chemisch-physikalische Parameter der untersuchten Schwefelquellen im Raum Garmisch-Partenkirchen.



## 4.1.3.2. Schwefelquellen

In der Gegend von Garmisch-Partenkirchen treten vermehrt Schwefelquellen zu Tage. Die Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung wurde an vier sulfidhaltigen Quellen durchgeführt (Abb. 50). Zwei entspringen nahe Eschenlohe (Hartsteinwerke, Eschenlohe), eine bei Kreuth (Stinkergraben) und eine bei Garmisch-Partenkirchen (Kochelberg).

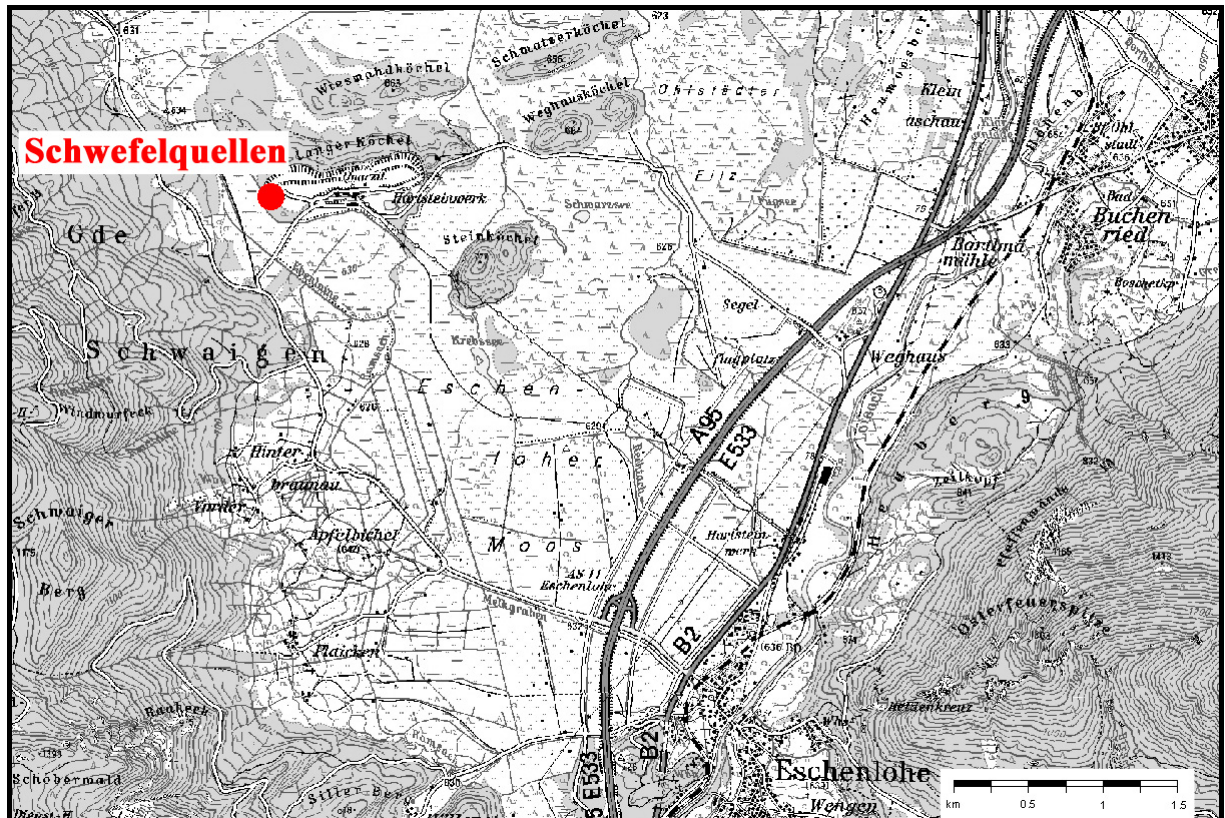


**Abb. 50:** Untersuchte Schwefelquellen im Raum Garmisch-Partenkirchen (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:1.000.000, verändert).

## 4.1.3.2.1. Hartsteinwerke bei Eschenlohe

Ein starker Austritt von Schwefelwasser befindet sich in dem Steinbruch Hartsteinwerke bei Eschenlohe (Abb. 51). Hierbei handelt es sich um einen ehemaligen Steinbruch, bei dem bis unter den Grundwasserspiegel gefördert wurde, so dass eine mit Wasser gefüllte Abbaugrube entstand. Auf dem Weg in diese Grube tritt auf einer Länge von ca. 20 m aus mehreren Quellen sulfidhaltiges Wasser unter Bildung kleiner Wasserfälle aus der steilen Wand aus (Abb. 52). Nach ihrem Zusammenfluss bilden sie einen gemeinsamen Bach, der in die gefüllte Abbaugrube mündet. Der Bachlauf und die durch die Wasserfälle überspülten Felsen

waren mit weißen Biofilmen überzogen. Weiße, flotierende Streamer mit einer Länge bis zu 15 cm konnten im Mündungstümpel eines Wasserfalles und im Bachlauf an Grashalmen entdeckt werden. Dort wurden unterhalb der tiefsten Schwefelquelle auch bräunliche Filamente ähnlicher Länge nachgewiesen.



**Abb. 51:** Lage der Schwefelquellen in den Hartsteinwerken bei Eschenlohe (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).





**Abb. 52:** Schwefelquellen der Hartsteinwerke bei Eschenlohe mit weißen Belägen.

#### 4.1.3.2.2. Eschenlohe

Die Schwefelquelle in Eschenlohe entspringt von Garmisch-Partenkirchen kommend links der B2 und ist durch Betonringe gefasst (Abb. 53). Diese Betonringe sind innen mit einem weißen Belag und Streamern bis zu einer Länge von 3 cm überzogen. Der Quellaustritt und der anschließende Bach waren mit weißen Belägen überzogen und enthielten an Gräsern bzw. Steine aufgewachsene, weiße Streamer mit einer Länge bis zu 10 cm (Abb. 54). Im Bachlauf konnten nach 3 m auch braune Filamente gleicher Länge gefunden werden.



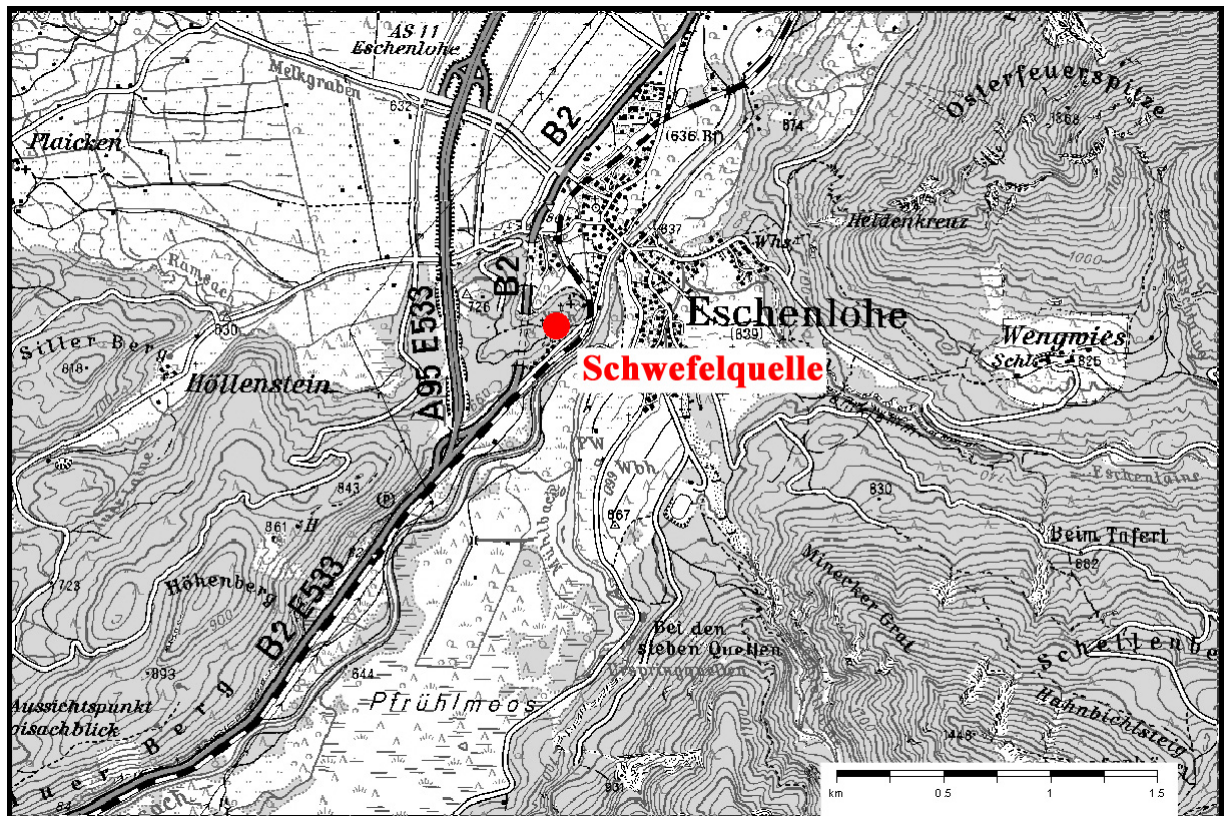


Abb. 53: Lage der Schwefelquelle bei Eschenlohe (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).



Abb. 54: Schwefelquelle bei Eschenlohe mit weißen Belägen am Austritt des Betonringes.





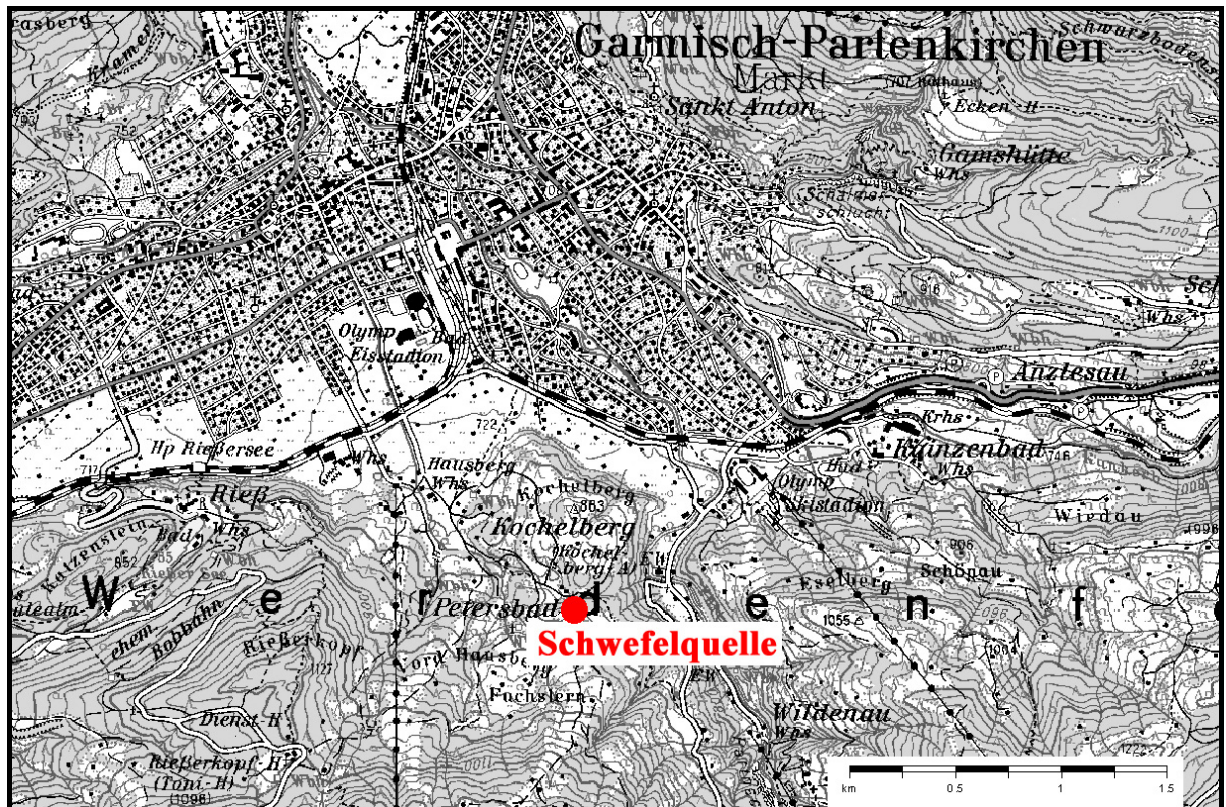


**Abb. 56:**  
Bachlauf mit weißen Belägen im Stinkergraben kurz unterhalb des Zulaufs der Schwefelquelle.

#### 4.1.3.2.4. Kochelberg

Die Schwefelquelle am Kochelberg schüttet über ein Metallrohr in ein kleines aus Natursteinen gemauertes Becken, das im Wald direkt neben dem Wanderweg auf den Kochelberg gelegen ist (Abb. 57). Im Quellbecken ( $\varnothing$  ca. 50 cm) befand sich Laub und kleine Äste der umgebenden Bäume, die wie der Ausfluss und Steine am Rand von weißen Belägen bedeckt waren (Abb. 58). Die Ausprägung dieser Biomatten war sehr schwach und der Geruch nach Schwefelwasserstoff kaum wahrnehmbar.





**Abb. 57:** Lage der Schwefelquelle am Kochelberg bei Garmisch-Partenkirchen (Ausschnitt aus TOP50 Südbayern, Maßstab: 1:50.000, verändert).



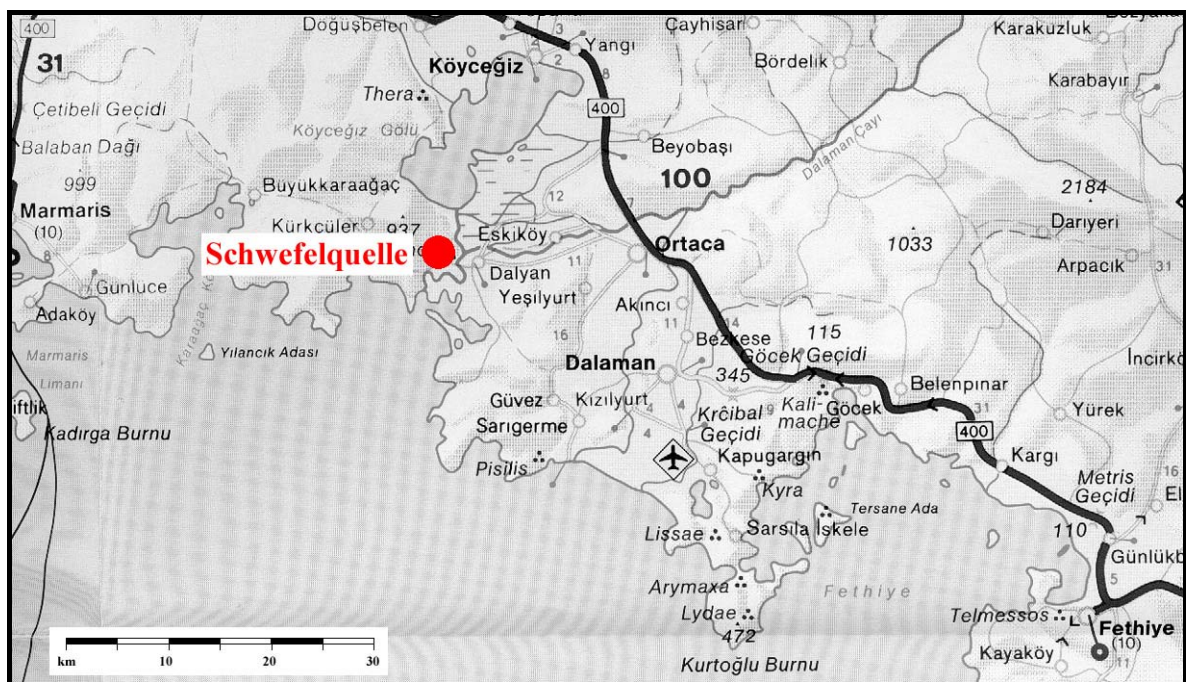
**Abb. 58:** Quellbecken der Schwefelquelle am Kochelberg bei Garmisch-Partenkirchen.



## 4.1.4. Türkei

## 4.1.4.1. Schwefelquelle

Zur Untersuchung der weiträumigen Verbreitung des SM1-Archaeons bzw. verwandter Mikroorganismen wurde eine Schwefelquelle bei Dalyan im Südwesten der Türkei (Abb. 59) beprobt. Bei dieser Schwefelquelle handelt es sich um eine genutzte, sulfidische Thermalquelle, deren Quellbach ein Schlammbad speist, das v.a. von Touristen stark genutzt wird. Sie tritt in einem geologisch sehr unruhigen Gebiet aus. Die Entstehung des Sulfids, dessen charakteristischer Geruch dort stark wahrnehmbar war, ist möglicherweise auf vulkanische Tätigkeit zurückzuführen. Die Probenahme erfolgte an dem Quellbach, etwa 30 m vor der Mündung in das Bad. Am Bachgrund und an Grashalmen befanden sich weiße Beläge (Abb. 60) und flotierende Streamer mit einer Länge bis zu 10 cm, die teilweise blasenartige Verdickungen ( $\varnothing$  bis 4 mm) aufwiesen.



**Abb. 59:** Lage der Schwefelquelle bei Dalyan in der Türkei (Ausschnitt aus ADAC Regionalkarte, Maßstab 1:500.000, verändert).



**Abb. 60:** Quellbach einer Schwefelquelle bei Dalyan/Türkei mit weißen Belägen.

#### 4.1.4.2. Chemisch-physikalische Parameter

Die Messung der chemischen Parameter dieser Quelle erfolgte im Gegensatz zu den Analysen der anderen Schwefelquellen im Labor, so dass der Sulfidgehalt nicht mehr bestimmt werden konnte. Die Schwefelquelle bei Dalyan unterscheidet sich in Bezug auf Temperatur, Leitfähigkeit und Salinität erheblich von den untersuchten Schwefelquellen in Bayern.

Parameter	Meßwert
Temperatur (°C)	38
pH	6,31
Leitfähigkeit (µS/cm)	34900
Salinität (g/l)	21,7

**Tab. 16:** Chemisch-physikalische Parameter der Schwefelquelle bei Dalyan/Türkei.

#### 4.2. FISH-Analysen

Unterschiedliche Biomatten aller Schwefelquellen wurden mittels FISH auf das Vorkommen von Archaeen untersucht, wie in II.12.5.1 beschrieben. Zum Einsatz kamen sowohl das Archaeen-spezifische Sondengemisch ARCH-Mix, als auch die SM1-spezifische Sonde SMARCH714, die gleichzeitig mit dem bakterien-spezifischen EUB338-Mix eingesetzt wurden. Um das Eindringen der Sonden in Zellen mit unterschiedlicher SDS-Empfindlichkeit sicherzustellen, wurden von jeder Probe drei Hybridisierungen mit verschiedenen SDS-Konzentrationen (0,005%, 0,1% und 0,5%) durchgeführt. Da mit höheren SDS-Konzentrationen keine weiteren Archaeen in den Proben nachgewiesen wurden, werden im Folgenden die FISH-Ergebnisse mit 0,005% SDS dargestellt.

Tabelle 17 zeigt den Nachweis von Archaeen mittels FISH in der jeweiligen Schwefelquelle und das makroskopische Auffinden von Perlenketten. Perlenketten wurden an drei Schwefelquellen des Sippenauer Moores (Probenahmeort Str. 1: Hauptquelle, Quelle unter Wurzel; Quelle I) und an der Quelle am Islinger Mühlbach nachgewiesen. Zellen, die mit der Sonde SMARCH714 hybridisierten konnten mit einer Ausnahme in allen Schwefelquellen des Sippenauer Moores nachgewiesen werden. Lediglich in dem Quellaufstoß wurden keine SM1-Archaeen gefunden, was an der eingeschränkten Probenmenge durch die Lage des Quellaustritts unter dem Wasserspiegel des Feckinger Baches und die sehr schwache Ausbildung von weißen Biofilmen liegen könnte.

Viele Schwefelquellen enthielten Mikroorganismen, die mit der Sonde ARCH-Mix hybridisierten, aber mit SMARCH714 kein positives Hybridisierungssignal ergaben. Diese Organismen waren überwiegend Kokken mit sehr unterschiedlichem Durchmesser von ca.  $1\mu\text{m}$  –  $3\mu\text{m}$  und traten sehr vereinzelt auf ( $\ll 0,1\%$  Zellanteil). Die Schwefelquelle in Bad Höhenstadt stellte eine Ausnahme dar, da dort ca. 1% der Gesamtzellzahl als archaeelle Kokken ( $\varnothing \sim 1\text{--}2\mu\text{m}$ ) identifiziert werden konnten. Stäbchenförmige Zellen, die mit dem Sondengemisch ARCH-Mix hybridisierten, konnten am Islinger Mühlbach und in Eschenlohe in sehr geringer Zellzahl ( $\ll 0,1\%$  Zellanteil) nachgewiesen werden.



Schwefelquelle	Perlenketten- struktur	FISH mit Sonde	
		ARCH-Mix	SMARCH714
Sippenauer Moor <i>Hauptquelle Str. 1</i>	+	+	+
Sippenauer Moor <i>Quelle unter Wurzel</i>	+	+	+
Sippenauer Moor <i>Quelle I</i>	+	+	+
Sippenauer Moor <i>Quelle II</i>	-	+	+
Sippenauer Moor <i>Quelltopf</i>	-	+	+
Sippenauer Moor <i>Weg</i>	-	+	+
Sippenauer Moor <i>Parkplatz</i>	-	+	+
Sippenauer Moor <i>Holzbrücke</i>	-	+	+
Sippenauer Moor <i>Künstlicher Auslauf</i>	+	+	+
Sippenauer Moor <i>Quellaufstoß</i>	-	-	-
Islinger Mühlbach	+	+	+
Bad Gögging <i>Wiesenquelle</i>	-	+	-
Bad Gögging <i>Tiberiusquelle</i>	-	+	-
Bad Gögging <i>Albertusquelle</i>	-	+	-
Sittling	-	+	-
Teugn	-	+	-
Irnsing	-	+	-
Barbing	-	-	-
Bad Höhenstadt	-	+	-
Pilzweg	-	+	-
Hartsteinwerke b. Eschenlohe	-	+	-
Eschenlohe	-	+	-
Stinkergraben	-	-	-
Kochelberg	-	-	-
Dalyan/Türkei	-	-	-

**Tab. 17:** Nachweis von Perlenketten, Archaeen bzw. SM1-Archaeen in Schwefelquellen.

### 4.3. Phylogenetische Analysen

Die Untersuchungen erfolgten an charakteristisch strukturierten, makroskopisch sichtbaren Biofilmen der Schwefelquellen. Hierzu wurden FISH-Analysen mit domänen- und SM1-spezifischen Sonden, sowie phylogenetische Analysen mit 16S rRNA-Gensequenzen durchgeführt. Diese 16S rRNA-Gensequenzen konnten aus der Umwelt über Archaeen-spezifische Amplifikationen mittels PCR erhalten werden.

#### 4.3.1. Klonierungen

##### 4.3.1.1. Islinger Mühlbach

Im Auslauf der Schwefelquelle am Islinger Mühlbach konnten flotierende Streamer mit blasenartigen Verdickungen ( $\varnothing$  bis zu 2 mm) nachgewiesen werden, die perlschnurartig aneinandergereiht waren und dem Erscheinungsbild der Perlenketten des Sippenauer Moores ähnelten (s. III.1.3.1). In diesem Quellbach waren bis zu 25 Perlen, die teilweise ein leicht fransiges Aussehen aufwiesen, an einem weißen, flotierenden Faden auf einer Länge bis zu 15 cm aneinandergereiht (Abb. 61). Unter dem Phasenkontrastmikroskop fielen neben filamentösen Mikroorganismen, die häufig stark lichtbrechende Schwefeleinschlüsse enthielten, große Ansammlungen kleiner Kokken auf, deren Erscheinungsbild den SM1-Archaeen glich (s. III.1.3.2.1). FISH-Analysen einzelner Perlen zeigten sowohl mit dem Archaeen-spezifischen Sondengemisch ARCH-Mix, als auch mit der SM1-spezifischen Sonde SMARCH714 ein positives Hybridisierungssignal. Für die Durchführung einer phylogenetischen Analyse wurde eine Perle entnommen und unter sterilen Bedingungen geteilt. In einem Teil wurden mittels FISH mit der SM1-sezifischen Sonde die SM1-Archaeen nachgewiesen, während aus dem anderen Teil DNA isoliert wurde. Aufgrund der geringen Zellmasse war die DNA-Ausbeute nach der Säulenreinigung sehr gering, weshalb durch anschließende PCR mit dem Archaeen-spezifischen Primern 345aF und dem universellen Primer 1512uR erst nach einer Reamplifikation (s. II.9.3) 16S rRNA-Gensequenzen in einer nachweisbaren Menge amplifiziert werden konnten. Aus der nachfolgenden Klonierung wurden 37 Klone zufällig ausgewählt und einem Vergleich mittels ARDRA unterzogen. Alle 37 untersuchten Klone zeigten nach Auftrennung auf dem Agarose-Gel das gleiche Restriktionspattern; die überprüften Klone enthielten somit die 16S rRNA-Gensequenz des gleichen Organismus. Vier dieser Klone wurden sequenziert und lieferten identische Basenfolgen, die Sequenzidentität zur 16S rRNA-Gensequenz des SM1-Archaeons aus dem Sippenauer Moor zeigten (Abb. 68).



**Abb. 61:** Perlenkette im Bachlauf der Schwefelquelle am Islinger Mühlbach.  
Maßstab: 20 mm.

#### 4.3.1.2. Bad Gögging

Von den Schwefelquellen Bad Gögging wurden flotierende Streamer des von der Albertusquelle gespeisten Baches für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die phylogenetische Analyse erfolgte an gräulichen Filamenten, die an einem Ast aufwuchsen und blasenartige Verdickungen aufwiesen (Abb. 62). Durch FISH mit den domänenspezifischen Sondengemischen ARCH-Mix und EUB-Mix konnte gezeigt werden, dass sich diese Biomatten hauptsächlich aus filamentösen Bakterien zusammensetzten. Selten ( $>> 0,1\%$ ) zeigten einzeln vorkommende Kokken ( $\varnothing$  bis zu  $5\mu\text{m}$ ) mit dem ARCH-Mix ein positives Hybridisierungssignal. Zellen, die mit der SM1-spezifischen Sonde SMARCH714 hybridisierten, konnten nicht nachgewiesen werden.

Aus den flotierenden Streamern (Abb. 62) wurde DNA isoliert, gereinigt (s. II.8.1) und eine PCR mit den archaeellen Primern 345aF – 1119aR, sowie mit 345aF – 1406uR durchgeführt. Diese PCR-Reaktionen lieferten keine Produkte, obwohl mit 10 ng DNA pro Ansatz eine ausreichende Menge eingesetzt werden konnte. Nach einer Reamplifikation (s. II.9.3) der Ansätze mit dem Primerpaar 345aF – 1119aR konnte eine nachweisbare Menge an PCR-Produkt erhalten werden, das für eine Klonierung eingesetzt wurde. Nach einem ARDRA (s. II.10.3) konnten die klonierten 16S rRNA-Gensequenzen von 24 zufällig ausgewählten

Klonen in 9 unterschiedliche Restriktionspattern eingeteilt werden, wovon 6 sequenziert wurden (Tab. 18). Die genaue phylogenetische Position dieser Sequenzvertreter ist im 16S rRNA-Stammbaum angegeben. Zur besseren Übersicht wurde die Gruppenzugehörigkeit dieser 16S rRNA-Gensequenzen nach der phylogenetischen Einordnung in die Tabelle aufgenommen.

	Restriktionspattern									
	gesamt	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Klon-anzahl	24	8	4	3	3	2	1	1	1	1
Sequenz-Vertreter	entf.	GOEG K138	--	GOEG K136	GOEG K143	GOEG K141	GOEG K142	GOEG K140	--	--
Gruppenzugehörigkeit	entf.	Methanogene	--	Methanogene	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	--	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 18:** Verteilung der Klone aus Bad Gögging nach Restriktionsverdau (ARDRA).



**Abb. 62:** Filamente mit Verdickungen (rote Pfeile) flotierend im schwefelhaltigen Wasser der Albertusquelle in Bad Gögging. Maßstab: 20 mm.

## 4.3.1.3. Sittling

Untersuchungen zur Verteilung der Archaeen wurden in der Schwefelquelle Sittling an weißen Belägen mit blasenartigen Verdickungen durchgeführt (Abb. 63). FISH-Analysen zeigten die Dominanz von filamentösen Bakterien in der Probe und lieferten weder mit dem domänenspezifischen Sondengemisch ARCH-Mix, noch mit der SM1-spezifischen Sonde SMARCH714 ein positives Hybridisierungssignal.

Nach DNA-Isolierung mit anschließender Reinigung wurde eine PCR mit den archaeellen Primern 345aF – 1119aR, sowie mit 345aF – 1406uR durchgeführt. Nach einer anschließenden Reamplifikation lieferte die PCR mit den Primern 345aF – 1119aR ein Produkt in nachweisbarer Menge, das kloniert wurde. 21 zufällig ausgewählte Klone konnten mittels Restriktionsverdau (ARDRA) in 10 unterschiedliche Restriktionspattern eingeteilt werden (Tab. 19). Drei Vertreter dieser Klongruppen wurden sequenziert und einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Die genaue Position dieser Sequenzvertreter ist im jeweiligen 16S rRNA-Stammbaum angegeben (s. III.4.3.2). Zur besseren Übersicht wurde die Gruppenzugehörigkeit dieser 16S rRNA-Gensequenzen nach der phylogenetischen Einordnung in die Tabelle 19 aufgenommen.

	Restriktionspattern										
	gesamt	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Klonanzahl	21	5	4	3	3	2	2	1	1	1	1
Sequenz-Vertreter	entf.	--	--	SIT K134	--	SIT K131	--	SIT K125	--	--	--
Gruppenzugehörigkeit	entf.	--	--	Methanogene	--	SM1-Gruppe	--	SM1-Gruppe	--	--	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 19:** Verteilung der Klone aus Sittling nach Restriktionsverdau (ARDRA).



**Abb. 63:** Weiße Beläge mit blasenartigen Verdickungen (roter Pfeil) im Bachlauf der Schwefelquelle in Sittling. Maßstab: 50 mm.

#### 4.3.1.4. Pilzweg

Das Vorkommen von Archaeen in der Schwefelquelle Pilzweg wurde an fädigen Grünalgen untersucht, die weiße, flauschige Verdickungen aufwiesen (Abb. 64). FISH-Analysen lieferten keine archaeellen Signale, zeigten aber eine starke Dominanz filamentöser Bakterien in dieser Probe.

Aus einem Teil der Probe wurde DNA isoliert (s. II.8.1) und über Säulen gereinigt (s. II.8.2). Die anschließende PCR mit den archaeellen Primerkombinationen 109aF – 1119aR und 345aF – 1119aR lieferte Amplifikate der erwarteten Größe, die beide kloniert wurden. Damit konnte ein primerunabhängiger Überblick über Archaeen erhalten werden, die in dieser Schwefelquelle vorkamen.

Aus der Klonierung der PCR-Produkte 109aF – 1119aR konnten 71 zufällig ausgewählte Klone mittels Restriktionsverdau (ARDRA) in 13 unterschiedliche Restriktionspattern eingeteilt werden (Tab. 20). Sieben Vertreter dieser Klongruppen wurden sequenziert und einer phylogenetischen Analyse unterzogen.





**Abb. 64:**  
Fädige Algen mit weißen, flauschigen Verdickungen in der Schwefelquelle Pilzweg.  
Maßstab: 10 mm.

	Restriktionspattern der Klonierung 109aF – 1119aF						
	gesamt	A	B	C	D	E	F
Klonanzahl	71	30	9	8	6	4	3
Sequenzierter Vertreter	entf.	PIL K54	PIL K104	PIL K10	PIL K20	PIL K61	--
Gruppenzugehörigkeit	entf.	<i>Cren-archaeota</i>	<i>Cren-archaeota</i>	<i>Cren-archaeota</i>	<i>Cren-archaeota</i>	<i>Cren-archaeota</i>	--
	Restriktionspattern der Klonierung 109aF – 1119aF						
	G	H	I	J	K	L	M
Klonanzahl	2	2	2	1	1	1	1
Sequenzierter Vertreter	PIL K13	PIL K21	--	--	--	--	--
Gruppenzugehörigkeit	SM1-Gruppe	<i>Cren-archaeota</i>	--	--	--	--	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 20:** Verteilung der Klone (Primer 109aF – 1119aF) aus Pilzweg nach Restriktionsverdau (ARDRA).

Der Restriktionsverdau von 35 zufällig ausgewählten Klonen aus der Klonierung 345aF – 1119aR lieferte 9 Gruppen, die sich im Bandenmuster voneinander unterschieden (Tab. 21). Die Sequenz je eines Vertreters der beiden dominierenden Klongruppen wurde ermittelt und ebenfalls einer phylogenetischen Analyse unterzogen.

Die genaue Position der Sequenzvertreter ist im jeweiligen 16S rRNA-Stammbaum angegeben (s. III.4.3.2). Zur besseren Übersicht wurde die Gruppenzugehörigkeit dieser 16S rRNA-Gensequenzen nach der phylogenetischen Einordnung in die Tabellen 20 und 21 aufgenommen.

	Restriktionspattern der Klonierung 345aF – 1119aF									
	gesamt	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Klon-anzahl	35	13	10	2	2	2	2	2	1	1
Sequenz-Vertreter	entf.	PIL K18	PIL K17	--	--	--	--	--	--	--
Gruppen-zugehörig-keit	entf.	Methano-gene	<i>Cren-archaeota</i>	--	--	--	--	--	--	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 21:** Verteilung der Klone (Primer 345aF – 1119aF) aus Pilzweg nach Restriktionsverdau (ARDRA).

#### 4.3.1.5. Bad Höhenstadt

Weißer Biomatten, die Steine und Laub überzogen, wurden aus der Schwefelquelle in Bad Höhenstadt für eine phylogenetische Analyse ausgewählt. Die Überprüfung mittels FISH ergab, dass die Probe von bakteriellen Filamentbildnern dominiert wurde. FISH-Analysen mit dem archaeellen Sondengemisch ARCH-Mix zeigten bei kokkenförmigen Organismen ( $\varnothing$  1 – 2  $\mu$ m) ein positives Hybridisierungssignal. Diese Kokken, die bis zu 1% der Gesamtzellzahl ausmachten, hybridisierten nicht mit der SM1-spezifischen Sonde SMARCH714 und waren aufgrund ihrer Größe auch morphologisch von den SM1-Archaeen zu unterscheiden.



**Abb. 65:** Weiße Beläge im Bachlauf der Schwefelquelle in Bad Höhenstadt. Maßstab: 50 mm.

Aus einem Teil der Probe wurde DNA isoliert (s. II.8.1), von PCR-hemmenden Begleitstoffen gereinigt (s. II.8.2) und anschließend in eine PCR der archaeellen 16S rRNA-Gene mit den spezifischen Primerkombinationen 345aF – 1119aR, sowie 109aF – 1119aR eingesetzt (s. II.9.1). Beide Primerkombinationen lieferten PCR-Produkte der erwarteten Größe, die kloniert wurden (s. II.10).

Von der Klonierung der PCR-Produkte mit der Primerkombination 345aF – 1119aR wurden 17 Klone zufällig ausgewählt und in einen Restriktionsverdau eingesetzt. Die Klone konnten in 6 verschiedene Restriktionsgruppen eingeteilt werden (Tab. 22), wovon zwei durch einen Vertreter sequenziert und die erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen phylogenetisch eingeordnet wurden.

	Restriktionspattern der Klonierung 345aF – 1119aF						
	gesamt	A	B	C	D	E	F
Klonanzahl	17	10	2	2	1	1	1
Sequenz-Vertreter	entf.	HOEH K23	HOEH K22	--	--	--	--
Gruppenzugehörigkeit	entf.	Methanogene	SM1-Gruppe	--	--	--	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 22:** Verteilung der Klone (Primer 345aF – 1119aF) aus Bad Höhenstadt nach Restriktionsverdau (ARDRA).

35 zufällig ausgewählte Klone aus der Klonierung der PCR-Produkte mit den Primern 109aF – 1119aR konnten durch einen Restriktionsverdau in 10 unterschiedliche Restriktionsgruppen eingeteilt werden (Tab. 23). Von zwei dieser Gruppen wurde je ein Vertreter sequenziert und einer phylogenetischen Analyse unterzogen.

Die genaue Position der Sequenzvertreter ist im jeweiligen 16S rRNA-Stammbaum angegeben (s. III.4.3.2). Zur besseren Übersicht wurde die Gruppenzugehörigkeit dieser 16S rRNA-Gensequenzen nach der phylogenetischen Einordnung in die Tabellen 22 und 23 aufgenommen.

	Restriktionspattern der Klonierung 109aF – 1119aF										
	gesamt	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Klonanzahl	35	10	5	5	5	4	4	4	3	2	2
Sequenz-Vertreter	entf.	HOEH K13	--	--	--	HOEH K17	--	--	--	--	--
Gruppenzugehörigkeit	entf.	SM1-Gruppe	--	--	--	SM1-Gruppe	--	--	--	--	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 23:** Verteilung der Klone (Primer 109aF – 1119aF) aus Bad Höhenstadt nach Restriktionsverdau (ARDRA).

## 4.3.1.6. Hartsteinwerke bei Eschenlohe

Aus den Schwefelquellen des Raumes Garmisch-Partenkirchen wurden die der Hartsteinwerke bei Eschenlohe für eine phylogenetische Analyse ausgewählt. In einem Quelltopf, der sich dort nach einem Wasserfall gebildet hat, konnten weiße, flotierende Streamer mit einer Gesamtlänge bis zu 15 cm nachgewiesen werden (Abb. 66). Die Überprüfung mittels FISH ergab, dass die Probe von bakteriellen Filamentbildnern dominiert wurde. FISH-Analysen mit dem archaeellen Sondengemisch ARCH-Mix, sowie mit der SM1-spezifischen Sonde SMARCH714 lieferten bei dieser Probe keine positiven Hybridisierungsergebnisse.

Aus einem Teil der Probe wurde DNA isoliert (s. II.8.1), über Säulen von PCR-hemmenden Substanzen gereinigt (s. II.8.2) und in eine PCR der archaeellen 16S rRNA-Gene mit den spezifischen Primerkombinationen 109aF – 1119aR, sowie 345aF – 1119aR eingesetzt. Nachdem kein PCR-Signal erhalten werden konnte, wurden die Ansätze reamplifiziert (s. II.9.3), was bei dem Ansatz 109aF – 1119aR zu einem PCR-Produkt der erwarteten Größe führte, das kloniert wurde (s. II.10). Durch einen Restriktionsverdau konnten 31 zufällig ausgewählte Klone in 3 Restriktionsgruppen eingeteilt werden, wovon je ein Vertreter sequenziert wurde (Tab. 24). Die erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen wurden phylogenetisch eingeordnet. Die genaue Position der Sequenzvertreter ist im jeweiligen 16S rRNA-Stammbaum angegeben (s. III.4.3.2). Zur besseren Übersicht wurde die Gruppenzugehörigkeit dieser 16S rRNA-Gensequenzen nach der phylogenetischen Einordnung in die Tabelle 24 aufgenommen.

	Restriktionspattern			
	gesamt	A	B	C
Klonanzahl	31	23	6	2
Sequenz-Vertreter	entf.	HSW K20	HSW K56	HSW K30
Gruppenzugehörigkeit	entf.	<i>Thermoplasma</i> - verwandte	<i>Thermoplasma</i> - verwandte	SM1- Gruppe

**Tab. 24:** Verteilung der Klone (Primer 109aF – 1119aF) aus Sittling nach Restriktionsverdau (ARDRA).



**Abb. 66:**

Weißer Biomatten einer Schwefelquelle der Hartsteinwerke bei Eschenlohe (Roter Pfeil: Weiße, flotierende Streamer).

Maßstab: 20 cm.

#### 4.3.1.7. Dalyan/Türkei

Aus dem Quellbach bei Dalyan in der Türkei wurden weiße, bis zu 10 cm lange Streamer mit kugelartigen Verdickungen entnommen, die im Bachlauf flotierten (Abb. 67). Während FISH-Analysen die Dominanz von bakteriellen Filamentbildnern zeigten, konnte mit dem archaeellen Sondengemisch ARCH-Mix kein positives Hybridisierungssignal erhalten werden.

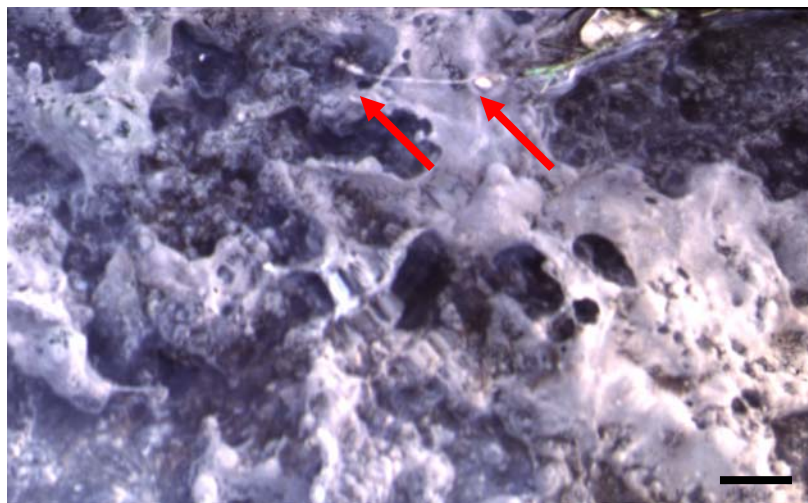
Aus einem Teil der Probe wurde DNA isoliert (s. II.8.1) und über eine Säulenreinigung PCR-hemmende Substanzen entfernt (s. II.8.2). Anschließend PCR-Amplifikationen der 16S rRNA-Gene mit den Primerkombinationen 109aF – 1119aR, 345aF – 1119aR und 345aF – 1406uR ergaben PCR-Produkte der erwarteten Größe, während eine Amplifikation mit den Primerkombinationen 109aF - 1406uR, 109aF – 1512uR und 345aF – 1512uR nicht möglich war. Das stärkste PCR Produkt konnte mit den Primern 345aF – 1119aR erzielt werden, weshalb es auch für eine Klonierung ausgewählt wurde. Durch einen Restriktionsverdau (ARDRA, s. II.10.3) konnten 36 zufällig ausgewählte Klone in 23 Restriktionsgruppen eingeteilt werden (Tab. 25). Von den fünf größten Klongruppen wurde je ein Vertreter sequenziert und die erhaltene 16S rRNA-Gensequenz einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Die genaue Position der Sequenzvertreter ist im jeweiligen 16S rRNA-

Stammbaum angegeben (s. III.4.3.2). Zur besseren Übersicht wurde die Gruppenzugehörigkeit dieser 16S rRNA-Gensequenzen nach der phylogenetischen Einordnung in die Tabelle 25 aufgenommen.

	Restriktionspattern der Klonierung 345aF – 1119aF						
	gesamt	A	B	C	D	E	23 weitere Pattern
Klonanzahl	36	4	3	2	2	2	1
Sequenz-Vertreter	entf.	DAL K39	DAL K16	DAL K4	DAL K13	DAL K40	--
Gruppenzugehörigkeit	entf.	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	SM1-Gruppe	--

-- nicht sequenziert

**Tab. 25:** Verteilung der Klone aus Dalyan/Türkei nach Restriktionsverdau (ARDRA).



**Abb. 67:** Weiße Biomatten und flotierende Filamente mit Verdickungen (rote Pfeile) im Bachlauf der Schwefelquelle bei Dalyan/Türkei. Maßstab: 20 mm.

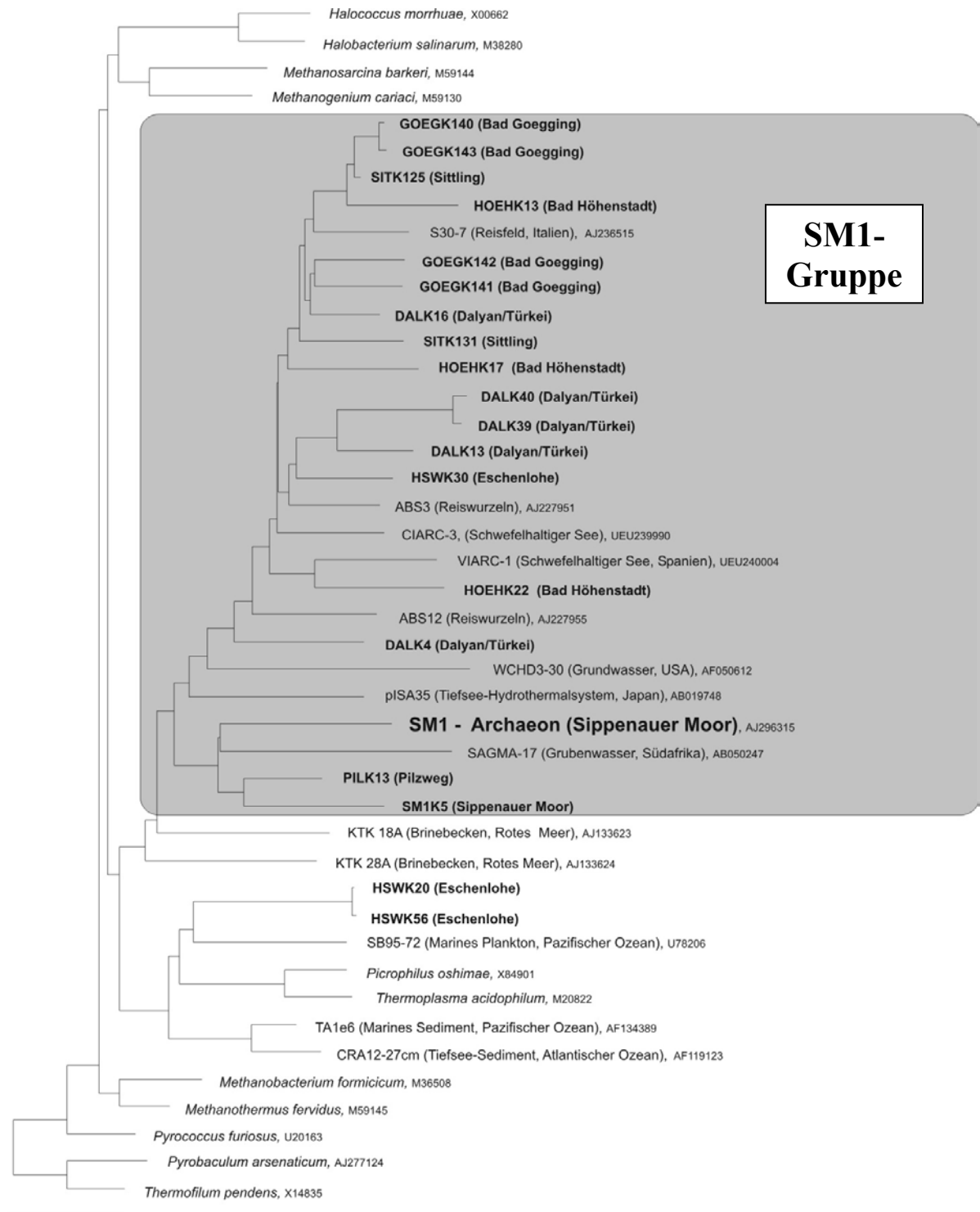
#### 4.3.2. Phylogenie

Phylogenetische Analysen ordneten die durch Klonierungen gewonnenen 16S rRNA-Gensequenzen aus den Schwefelquellen drei phylogenetischen Gruppen zu.

##### 4.3.2.1. SM1-Gruppe

Die 16S rRNA-Gensequenzen aus den Klonierungen wurden einem Alignment mit den 16S rRNA-Gensequenzen der ADR unterzogen. Der überwiegende Teil der Sequenzen aus den Schwefelquellen zeigte zu allen bisher bekannten 16S rRNA-Sequenzen nur sehr entfernte Verwandtschaft und bildete eine Sequenzgruppe, obwohl der phylogenetische Abstand der einzelnen Sequenzen zueinander sehr groß ist (Abb. 68). Diese Sequenzgruppe, die in Abb. 68 grau hinterlegt wurde, beinhaltet die 16S rRNA-Gensequenz des SM1-Archaeons aus den Perlenketten des Sippenauer Moores und wird deshalb als SM1-Gruppe definiert. In allen untersuchten Schwefelquellen konnten Vertreter dieser Sequenzgruppe nachgewiesen werden. Bei den wenigen, schon bekannten Datenbanksequenzen, die ebenfalls in die SM1-Gruppe fallen, handelt es sich um Klonsequenzen unkultivierter Mikroorganismen aus der Umwelt. Eine Auswahl dieser Umweltsequenzen mit ihren Nachweisorten ist im phylogenetischen Stammbaum aufgenommen (Abb. 68). Die nächsten verwandten Gattungen kultivierter Mikroorganismen (*Thermoplasma* und *Picrophilus*) besitzen einen phylogenetischen Abstand von über 20%. Eine deutlich nähere Verwandtschaft zu den Gattungen *Thermoplasma* und *Picrophilus* zeigte der überwiegende Teil der 16S rRNA-Gensequenzen aus der Schwefelquelle der Hartsteinwerke bei Eschenlohe (HSWK20, HSWK56), weshalb sie nicht in die SM1-Gruppe aufgenommen wurden.

Die Baumtopologie des in Abb. 68 dargestellten, phylogenetischen Stammbaumes wurde durch Distance-Matrix und Maximum Parsimony-Analysen mit verschiedenen Filtern (*Archaea*-, *Euryarchaeota*- und Terminifilter) gestützt. Trotz des großen phylogenetischen Abstandes, den die einzelnen Sequenzen der SM1-Gruppe untereinander besitzen, bildeten sie in allen durchgeführten Berechnungen eine stabile Gruppe.



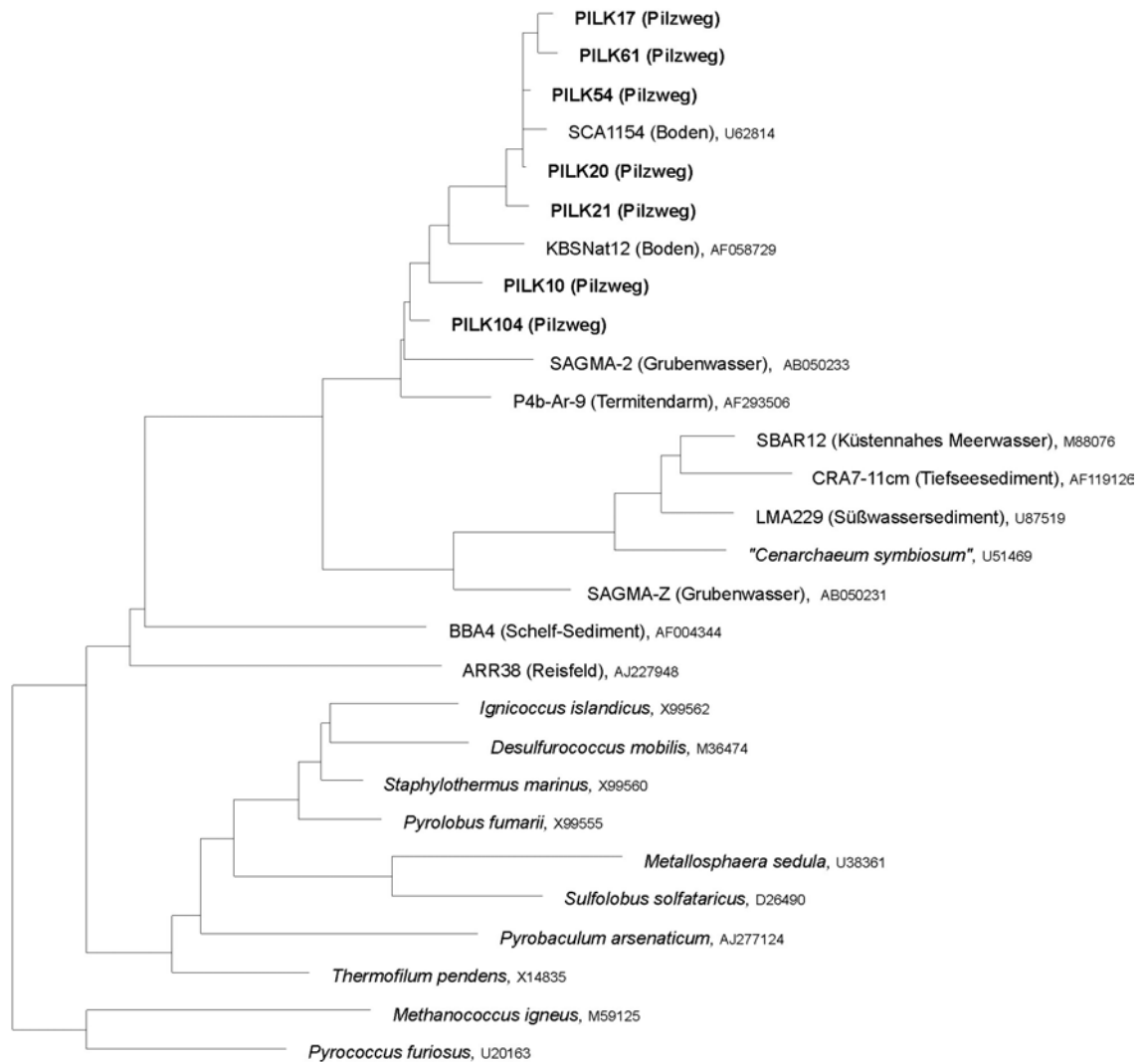
**Abb. 68:** 16S rRNA phylogenetischer Stammbaum der archaellen Domäne mit den Sequenzen der Schwefelquellen (Fettdruck) basierend auf einer Maximum-Parsimony Analyse. Die Nachweisorte der Klonsequenzen sind in Klammern angegeben und die Datenbanknummern der Vergleichssequenzen angezeigt. Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

#### 4.3.2.2. Crenarchaeota

Aus der Schwefelquelle bei Pilzweg erhaltene 16S rRNA-Gensequenzen ließen sich in einem Alignment mit den 16S rRNA-Gensequenzen der ADR phylogenetisch überwiegend den *Crenarchaeota* zuordnen. Die Sequenzen zeigten eine nahe Verwandtschaft untereinander und konnten einer Sequenzgruppe zugeordnet werden, die viele 16S rRNA-Gensequenzen aus verschiedensten Biotopen aufweist. Bei allen Vertretern dieser Sequenzgruppe handelt es sich um Umweltsequenzen unkultivierter Mikroorganismen mit großer phylogenetischer Distanz zu allen kultivierten Vertretern der *Crenarchaeota*.

Die Baumtopologie des in Abb. 69 dargestellten, phylogenetischen Stammbaumes wurde durch Distance-Matrix und Maximum Parsimony-Analysen mit verschiedenen Filtern (*Archaea*-, *Crenarchaeota*- und Terminifilter) gestützt.

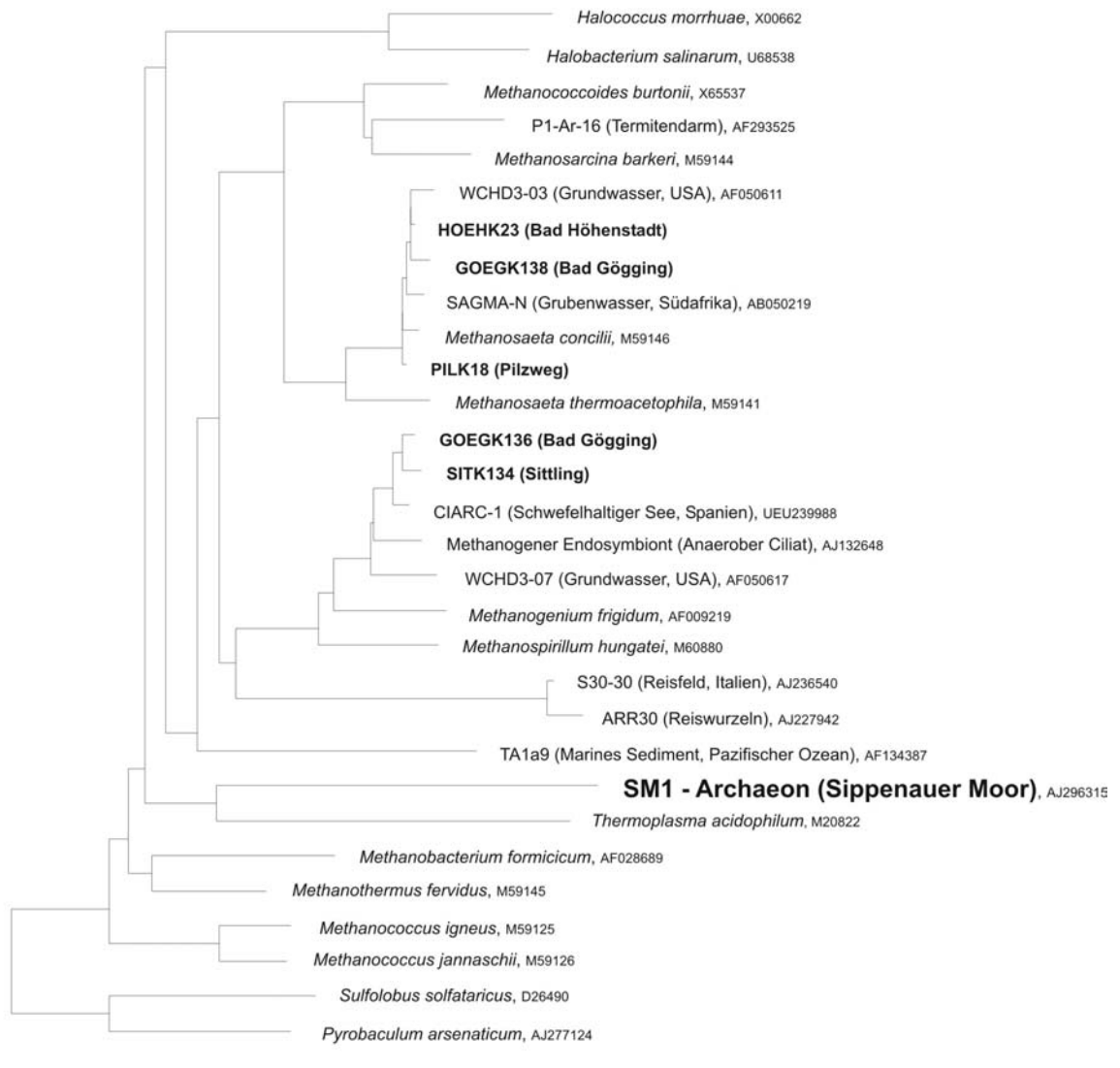




**Abb. 69:** 16S rRNA phylogenetischer Stammbaum der *Crenarchaeota* mit den Sequenzen der Schwefelquellen (Fettdruck) basierend auf einer Maximum-Parsimony Analyse. Die Nachweisorte der Klonsequenzen sind in Klammern angegeben und die Datenbanknummern der Vergleichssequenzen angezeigt. Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

## 4.3.2.3. Methanogene Archaeen

Aus vier untersuchten Schwefelquellen konnten 16S rRNA-Gensequenzen ermittelt werden, die sich durch ein Alignment mit den 16S rRNA-Gensequenzen der ADR phylogenetisch den Methanogenen zuordnen ließen. Innerhalb der Methanogenen gruppieren sie alle in der Familie der *Methanomicrobiaceae*.



**Abb. 70:** 16S rRNA phylogenetischer Stammbaum der Methanogenen mit den Sequenzen der Schwefelquellen (Fettdruck) basierend auf einer Maximum-Parsimony Analyse. Die Nachweisorte der Klonsequenzen sind in Klammern angegeben und die Datenbanknummern der Vergleichssequenzen angezeigt. Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

## 5. G+C-Gehaltsbestimmung des SM1-Genoms

Die Bestimmung des G+C-Gehaltes erfolgte mittels HPLC bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig). Dabei ergab sich der G+C-Gehalt der eingesetzten DNA als Mittelwert unter Berücksichtigung aller darin enthaltenen Mikroorganismen. Um den Fehler durch Verunreinigungen bei der G+C-Gehaltsbestimmung zu minimieren, wurde darauf geachtet, möglichst reine Fraktionen von SM1-Archaeen als Ausgangsmaterial zu gewinnen. Hierzu wurden zwei Proben derart aufgereinigt, dass die Archaeen in einer Reinheit >98% vorlagen. Als Proben wurden sowohl SM1-Archaeen eingesetzt, die von bewachsenen Polyethylen-Netzen im Sippenauer Moor in einer Aufreinigung ohne Percoll angereichert wurden (Probe: SipGC; s. II.7.6), als auch Archaeen, die aus gallertartigen Strukturen des Islinger Mühlbaches gewonnen werden konnten (Probe: IslGC; s. II.7.7). Die Probenahmen erfolgten je Ansatz an zwei unterschiedlichen Tagen und die beiden gereinigten Fraktionen mit SM1-Archaeen wurden vereinigt. Damit lag für jeden Probenahmestandort eine Mischprobe vor. Bei beiden Proben konnten nahezu der gleiche G+C-Gehalt von ca. 35% erhalten werden (Tab. 26). Die geringe Abweichung lässt sich durch die verschiedenen Begleitorganismen mit unterschiedlichem G+C-Gehalt erklären, die die Umweltproben trotz Aufreinigung der SM1-Archaeen noch enthielten.

Probenbezeichnung	Probenahmeort	G+C-Gehalt (mol%)
SipGC	Sippenauer Moor (Polyethylenetze)	34,5
IslGC	Islinger Mühlbach (Polyethylenetze)	36,1

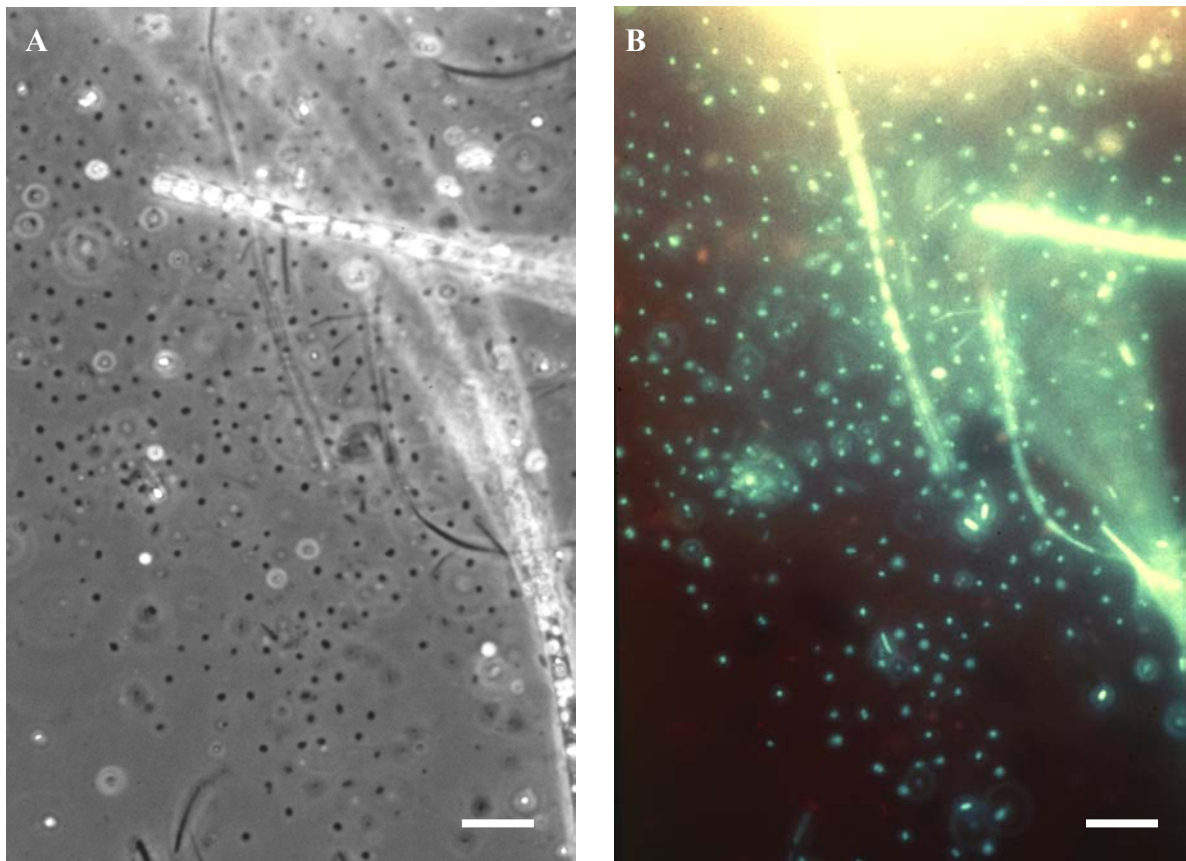
**Tab. 26:** G+C-Gehalt der SM1-Archaeen in verschiedenen Proben.

## 6. Physiologie der neuartigen SM1-Archaeen aus den Perlenketten

### 6.1. Bestimmung der Lebensfähigkeit

#### 6.1.1. SM1-Archaeen in den Kugeln

Die Lebensfähigkeit von SM1-Archaeen in den Perlen wurde mit dem Lebend/Tot-Farbstoffgemisch LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes) ermittelt. Nach Zugabe des Farbstoffes wurde ein Quetschpräparat der Perlen angefertigt. Anhand der charakteristischen Struktur der SM1-Kolonien in den Perlen (s. III.1.3.2.1) konnten die SM1-Archaeen sicher erkannt werden. Zellen mit intaktem Membranpotential (lebend) erschienen unter UV-Licht grün, während tote Zellen rot gefärbt waren (Abb. 71). In einer Versuchsreihe wurden 10 Perlen untersucht, wobei mehr als 95% der kleinen Kokken lebensfähig waren. Bei sehr langer Betrachtung der Zellen unter UV-Licht konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass die Färbung einiger Zellen von grün nach rot umschlug, was auf einen Verlust des Membranpotentials und somit auf das Absterben dieser Zellen hindeutete.



**Abb. 71:** Quetschpräparat einer Perle aus dem Sippenauer Moor. Maßstab: 10 µm  
(A) Phasenkontrastaufnahme.  
(B) Fluoreszenzaufnahme der BacLight™-Färbung. Lebende Zellen leuchten grün, tote Zellen rot.

### 6.1.2. Aufkonzentrierte SM1-Archaeen

Einige Versuche erfolgten mit SM1-Archaeen, die über mehrere Sedimentations- und Zentrifugationsschritte gereinigt und aufkonzentriert wurden (s. II.7) und deren Lebensfähigkeit eine wichtige Grundlage für weitere Versuche darstellte. Die Lebensfähigkeit der mit oder ohne Percoll aufgereinigten Zellen variierte bei der Bestimmung mit LIVE/DEAD® BacLight™ probenabhängig, allerdings wurden stets über 90% lebende Zellen nachgewiesen. Nachdem diese Abschätzungen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop durch Abzählen rot (tot) oder grün (lebend) erscheinender Zellen erfolgten, konnten die Proben nur stichpunktartig untersucht werden. Um einen Fehler durch nicht repräsentative Stichproben auszuschließen, wurde eine quantitative Analyse der Lebensfähigkeit einer größeren Zellzahl mit einem Zellsorter durchgeführt. Den Anteil lebensfähiger Zellen einer Probe lieferte der Quotient aus der Anzahl lebender Zellen und der Gesamtzellzahl einer Probe. Während die Gesamtzellzahl durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermittelt wurde, der alle Zellen unabhängig vom physiologischen Zustand anfärbte, erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl durch einen Farbstoff, der physiologisch intakte Zellen gezielt markierte. Um geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zu finden, deren Signalstärke und Abgrenzung zu unspezifischer Hintergrundfärbung eine genaue Messung zuließen, wurden unterschiedlich gefärbte SM1-Zellen getestet. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden der DNA-interkalierende Farbstoff SYBR® Green I bzw. der proteinspezifische Farbstoff TAMRA (5- (und 6-) carboxytetramethylrhodamin-succinidimidylester) eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass der Proteinfarbstoff TAMRA bei SM1-Archaeen ein wesentlich deutlicheres Signal lieferte als SYBR® Green I, weshalb er zur Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet wurde. Für die Markierung lebender Zellen wurde neben dem Esterasefarbstoff Calcein AM, der nach Spaltung durch Esterasen grüne Fluoreszenz zeigt, auch das Lebend/Tot-Farbstoffgemisch LIVE/DEAD® BacLight™ getestet, durch das lebende Zellen grüne Fluoreszenz zeigten. Nachdem der Farbstoff Calcein AM auch nach zweimaligem Waschen der Probe eine sehr starke Hintergrundfluoreszenz verursachte und die Entstehung der grünen Fluoreszenz auch photoinduziert wurde, erfolgte die Markierung lebender Zellen mit LIVE/DEAD® BacLight™.

Die Bestimmung der Lebensfähigkeit erfolgte an Aliquots von 0,5 ml einer Aufreinigung (ohne Percoll) und wurde in 4 Parallelen für verschiedene Farbstoffe durchgeführt (Tab. 27). Auf diese Weise konnten Fehler minimiert werden, wie sie z.B. durch die Ungleichverteilung der SM1-Archaeen durch Bildung kleiner Biofilme auftreten könnten. So schwankten die

einzelnen Messwerte bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl (TAMRA-Färbung) um 19% und bei der Lebendzellzahlbestimmung (LIVE/DEAD® BacLight™) um 12%. Die mittlere Gesamtzellzahl lag somit bei  $5,7 \times 10^7$  Zellen/ml, was über die Thoma-Zählkammer mit einem Wert von  $6 \times 10^7$  Zellen/ml bestätigt wurde. Der Anteil lebender Zellen entsprach dem prozentualen Anteil der Fluoreszenzereignisse nach Färbung mit LIVE/DEAD® BacLight™ verglichen mit der Anzahl nach TAMRA-Färbung. Die ohne Percoll aufgereinigten SM1-Archaeen waren somit zu 85,4% lebend. Die Reinheit der SM1-Archaeen wurde mittels FISH mit der SM1-spezifischen Sonde überprüft und entsprach 98%.

Messung	Anzahl der von Zellsorter detektierten Ereignisse	
	TAMRA-Färbung	Färbung LIVE/DEAD® BacLight™
1	2668368	2269021
2	2982808	2391096
3	3108205	2450820
4	2568555	2562511
Mittelwert	2831984	2418362

**Tab. 27:** Anzahl der vom Zellsorter detektierten Fluoreszenzereignisse von jeweils 0,5 ml Probe nach Färbung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

## 6.2. Messung von Methan in der Gasphase „älterer“ Perlen

Der Durchmesser der Perlen im Sippenauer Moores vergrößert sich mit der Zeit und kann nach 4 Tagen bis zu 8 mm betragen. In diesem Stadium wurde im Inneren einzelner Perlen Gas festgestellt, das die einzelnen Perlen zur Wasseroberfläche drückte und das bei der Probenahme die Perlen an der Wasseroberfläche kollabieren ließ. Die Analyse der Gasphase sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den SM1-Archaeen um Methanogene handelt.



### 6.2.1. Probenahme gasgefüllter Perlen

Wie unter II.15.1 beschrieben wurden je Ansatz zwei gasgefüllte Perlen geerntet und in einem verschlossenen Rollrandgefäß zum Platzen gebracht. Die so entstandenen Gasphasen sollten am GC zusammen mit den Kontrollen (s. II.15.2) analysiert werden.

### 6.2.2. Methanbestimmung der Gasphase

Nach Verschließen der Rollrandgefäße waren noch 1,5 ml Gasphase enthalten. Jede der beiden Perlen einer Probe hatte einen Durchmesser von ca. 8 mm und beinhaltete eine Gasblase von ca. 3 mm Durchmesser. Die Gasmenge der Perlen lag somit bei ca. 25 µl. Am Gaschromatographen wurden für beide Proben Werte im Bereich der 1:1440-Verdünnung von Methan gemessen (Tab. 28). Durch die Messwerte der Kontrollen kann auch der störende Einfluss von Probenwasser oder evtl. in den Perlen enthaltenes Methanol ausgeschlossen werden.

Der kleinste Methananteil an der Gesamtmenge freigesetzten Gases aller bekannten methanogenen Stoffwechsel entsteht bei dem Umsatz von Formiat und liegt bei 25%. Geht man von diesem Anteil aus, so sind in den 1,5 ml Gasphase mindestens 7 µl Methan enthalten, es liegt also ungefähr eine 200-fache Verdünnung vor.

Nachdem am Gaschromatographen für beide Proben Werte im Bereich der 1:1440-Verdünnung von Methan gemessen wurden (Tab. 28), ist die Methankonzentration im Gas der Perlen ungefähr siebenfach geringer als bei einem methanogenen Stoffwechsel mindestens zu erwarten wäre. Alle theoretischen Annahmen lagen zusätzlich im unteren Bereich der tatsächlich zu erwartenden Größen.

Probenbezeichnung	Probenbeschreibung	Integral des Methanpeaks
Probe 1	Zwei ältere Perlen aus dem Sippenauer Moor (Str.1)	137.490
Probe 2	Zwei ältere Perlen aus dem Sippenauer Moor (Str.1)	174.320
Kontrolle	Kontrolle behandelt wie Proben; Zusatz von Methan	9.175.500
Methan	Methanverdünnung 1:1440	165.520
Methanol	Gasphase einer Methanolfflasche	29.714

**Tab. 28:** Bestimmung der Methankonzentration am Gaschromatographen

### 6.3. Sulfitreduktase

Die Sulfitreduktase stellt sowohl bei Archaeen als auch bei Bakterien das Schlüsselenzym der Sulfatreduktion dar und ist stark konserviert<sup>183</sup>. Der Nachweis des Sulfitreduktase-Gens erfolgte mittels PCR. Zum Einsatz kamen unterschiedliche Kombinationen von Primern, die als universell für alle bekannten, sulfatreduzierenden Bakterien und Archaeen beschrieben sind<sup>183</sup>. Die Existenz archaeeller Sulfitreduktase-Gene in den Perlenketten des Sippenauer Moores sollte mittels PCR-Ansätzen überprüft werden. Von den PCR-Ansätzen DSR1F – DSR3R, DSR1F – DSR4R, DSR2F – DSR3R und DSR2F – DSR4R lieferte nur der Ansatz 1F – 3R nach Reamplifikation ein PCR-Produkt der erwarteten Größe (~1,1 kb). Allerdings waren auf dem Agarosegel noch zwei Banden größerer Fragmente zu erkennen. Nach der anschließenden Klonierung wurden 23 Klone mit dem Insert richtiger Größe über PCR-Screening ermittelt und mittels Restriktionsverdau in 8 Klongruppen eingeteilt (Tab. 29). Ein Vertreter jeder Klongruppe wurde sequenziert und homologe Gene über einen Vergleich mit allen hinterlegten Gensequenzen der Datenbank Genbank ermittelt (Blast-Suche). Lediglich eine Klonsequenz war zu Sulfitreduktase-Genen homolog und zeigte eine sehr große Übereinstimmung mit dem Sulfitreduktase-Gen von *Desulfobacterium cetonicum*. Eine Homologie zu den sulfatreduzierenden Archaeen der Gattung *Archaeoglobus* wurde nicht festgestellt. Die Sequenzen der anderen Restriktionspattern ließen sich entweder 16S rRNA-Genen zuordnen oder zeigten keine Homologien zu bisher bekannten Genen.

	Restriktionspattern der Klonierung DSR1F – DSR3R								
	gesamt	A	B	C	D	E	F	G	H
Klon-anzahl	23	5	5	4	3	2	2	1	1
Sequenz-Vertreter	entf.	K6	K17	K11	K9	K7	K12	K10	K21
Homolog zu	entf.	16S-rRNA Gen	16S-rRNA Gen	Keine Zuordnung	Keine Zuordnung	16S-rRNA Gen	Keine Zuordnung	Sulfitreduktase	Keine Zuordnung

**Tab. 29:** Klonverteilung der Sulfitreduktase-Klonierung nach Restriktionsverdau.

Als Kontrolle wurden zusätzlich PCR-Ansätze aller Primerkombinationen mit DNA von gallertartigen Ansammlungen von SM1-Archaeen aus dem Islinger Mühlbach durchgeführt. Hierbei konnte in keinem Ansatz ein PCR-Produkt erhalten werden. Diese Ergebnisse zeigen,

dass das SM1-Archaeon zumindest keine Sulfitreduktase-Gene besitzt, die mit den bisher bekannten Primern nachgewiesen werden könnten.

#### 6.4. Bestimmung des Coenzym $F_{420}$

Das Coenzym  $F_{420}$  wurde bisher ausnahmslos bei allen Methanogenen in höheren Konzentrationen aufgefunden. Auch in den sulfatreduzierenden Archaeen der Gattung *Archaeoglobus* konnte dieses Coenzym in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden, die aber deutlich unterhalb der von Methanogenen liegt. Die Untersuchungen der Perlen des Sippenauer Moores auf das Coenzym  $F_{420}$  liefern somit einen wichtigen Hinweis auf einen methanogenen Stoffwechsel der SM1-Archaeen.

##### 6.4.1. Kontrollen

Die Bestimmung der Konzentration an Coenzym  $F_{420}$  erfolgte photometrisch. Die gemessene optische Dichte bei 420 nm korreliert dabei direkt mit der Menge des Coenzym. Die Empfindlichkeit der Methode wurde durch die Untersuchung von Vergleichsorganismen in unterschiedlicher Konzentration überprüft (Tab. 30). Als Nullkontrolle diente *Aquifex pyrophilus*, der kein Coenzym  $F_{420}$  enthält. Der Acetonüberstand vor Auftrag auf die Säule und die anschließend gesammelten Fraktionen (s. II.16.2) waren klar und farblos. Die Summe der daraus ermittelten O.D.<sub>420</sub>-Werte der einzelnen Fraktionen lag nahe null (Tab. 30) und damit im Fehlerbereich der Methode. *Archaeoglobus fulgidus* hingegen zeigt im Mikroskop unter UV-Licht bei 420 nm ein schwaches Leuchten, was auf Coenzym  $F_{420}$  zurückzuführen ist. Bei diesem Organismus handelt es sich um einen „Minimethanbildner“, der zusätzlich zu seinem sulfatreduzierenden Stoffwechsel geringe Mengen an Methan bildet, die aber für eine rein methanogene Energiegewinnung nicht ausreichen.

Die Acetonextraktion dieses Organismus lieferte bräunlich-rot bis mittelbraun gefärbte Überstände. Durch die Auftrennung über die Ionenaustauschsäule ergaben sich unterschiedlich gefärbte Banden bzw. Fraktionen, die getrennt voneinander gesammelt wurden. Eine deutliche Gelbfärbung der Fraktionen ging mit dem Nachweis von Coenzym  $F_{420}$  einher. *Archaeoglobus fulgidus* besitzt unter den bisher bekannten nicht-methanogenen Organismen den höchsten Gehalt an Coenzym  $F_{420}$ .

Methanogene Organismen, deren Energiegewinnung über Methanproduktion erfolgt, übertreffen diese Konzentration an Coenzym  $F_{420}$  erheblich, wie an den O.D.-Werten von

*Methanococcus igneus* zu erkennen ist (s. Tab. 30). Die Acetonüberstände waren in diesem Fall gelblich-braun gefärbt. Auch hier konnten über die Ionenaustauschsäule unterschiedlich gefärbte Fraktionen erhalten werden, wobei die Coenzym F<sub>420</sub> enthaltenden Fraktionen stark gelb gefärbt waren.

Kontrollorganismus	Zellmasse (g)	O.D. (420 nm)
<i>Aquifex pyrophilus</i>	1,0	0,0020
<i>Aquifex pyrophilus</i>	0,25	0,0010
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	0,1	1,8132
<i>Methanococcus igneus</i>	0,1	3,1023

**Tab. 30:** Gehalt an Coenzym F<sub>420</sub> verschiedener Vergleichsorganismen

#### 6.4.2. F<sub>420</sub>-Gehalt der Mikroorganismen in den Perlen

Die Messungen des Coenzym F<sub>420</sub> erfolgten jeweils an einer Mischung aus möglichst definierten Perlen bis zu einem Durchmesser von 5 mm. Die Entnahme der Perlen erfolgte an fünf unterschiedlichen Tagen im Sippenauer Moor am Probenahmeort Str. 1 stets unmittelbar vor dem Aufschließen. Die Acetonüberstände aller Proben waren grünlich gefärbt. Die Summe der O.D.<sub>420</sub>-Werte der einzelnen Fraktionen, die Coenzym F<sub>420</sub> enthielten, lag in allen Fällen deutlich unter den Vergleichswerten der Kontrollen (s. Tab. 31). Zumeist konnte trotz hoher Auflösung nur ein sehr schwacher Peak im Absorptionsspektrum festgestellt werden, der kaum vom Untergrundrauschen zu unterscheiden war. Der an den Perlen gemessene Gehalt an Coenzym F<sub>420</sub> erreichte im günstigsten Fall 0,4% des Wertes von *Archaeoglobus fulgidus* (s. Tab. 31). Die Kontrolle aus weißen Filamenten ohne Perlenstruktur (Probe IV<sub>undefiniert</sub>) zeigte, dass auch in undefinierten Strukturen Coenzym F<sub>420</sub> bis zu einem relativen Anteil von 0,3% gemessen wurde. Die erhaltenen Messwerte der Perlen lagen somit alle im Schwankungsbereich der Umweltproben und zeigten keinen signifikanten Anteil an Coenzym F<sub>420</sub>.

Probe	Proben- beschreibung	Zellmasse (g)	O.D. (420 nm)	O.D. (420 nm) bei 0,1 g Zellmasse	O.D. <sub>420</sub> relativ zu <i>Archaeoglobus fulgidus</i> (%)
I	Perlen	0,13	0,0010	0,0008	0,04
II	Perlen	0,25	0,0077	0,0031	0,2
III	Perlen	0,42	0,0100	0,0024	0,1
IV	Perlen	0,09	0,0010	0,0011	0,1
IV <sub>undefiniert</sub>	Weißes Filamente	0,4	0,0181	0,0045	0,3
V	Perlen	0,37	0,02524	0,0167	0,4

**Tab. 31:** Gehalt an Coenzym F<sub>420</sub> der Perlen aus dem Sippenauer Moor

#### 6.4.3. Coenzym F<sub>420</sub> aufkonzentrierter SM1-Archaeen

Die photometrische Messung des Coenzym F<sub>420</sub> erfolgte zusätzlich an angereicherten (Fraktion A, II.7.3) bzw. gereinigten SM1-Archaeen (Fraktion C, II.7.4) der Perlen aus dem Sippenauer Moor. Die Zellen waren an Polyethylennetzen gewachsen, die im Biotop am Probenahmeort Str. 1 ausgebracht worden waren (s. II.7.2). Nach dem Anreichern bzw. der Reinigung der SM1-Archaeen (s. II.7.3, II.7.4) wurde deren Anteil an der Gesamtzellzahl durch FISH mit der spezifischen SM1-Sonde SMARCH714 (s. II.12.5.1) ermittelt. In SM1-angereicherten Fraktionen wurde ein Anteil von 30% SM1-Archaeen erreicht. Gereinigte Fraktionen, enthielten nach Entfernung des Percolls 60% SM1-Archaeen (s. II.7.5). Beide Fraktionen zeigten im Vergleich zu *Archaeoglobus fulgidus* erheblich niedrigere O.D.<sub>420</sub>-Werte und damit einen niedrigeren Gehalt an Coenzym F<sub>420</sub>. Obwohl die gereinigte Fraktion 60% SM1-Archaeen enthielt, entsprach der gemessene O.D.<sub>420</sub>-Wert nur 1,3%, während er bei der angereicherten Fraktion mit 30% SM1-Archaeen-Anteil 3,0% betrug. Der O.D.<sub>420</sub>-Gehalt verhielt sich somit nicht proportional zum Anteil an SM1-Archaeen und war zudem deutlich niedriger als bei *Archaeoglobus fulgidus*. Dieses Ergebnis wurde durch das Fehlen der typischen Methanogenen-Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt, das bei den SM1-Archaeen festgestellt wurde.

Als Kontrolle der Methode wurde ein Aliquot (0,2 g) der angereicherten Fraktion (Fraktion A mit 30% SM1-Archaeen; II.7.3) mit 0,1 g Zellmasse von *Methanococcus igneus* versetzt und

wie die anderen Proben behandelt. Der erhaltene O.D.<sub>420</sub>-Wert lag mit 3,2149 in ähnlicher Größenordnung wie die ausschließlich aus *Methanococcus igneus*-Zellen bestehende Kontrolle mit einem O.D.<sub>420</sub>-Wert von 3,1023 (s. Tab 32). Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Methodik durch die Umweltproben nicht beeinflusst wurde.

Probe	Proben- beschreibung	Zellmasse (g)	O.D. (420 nm)	O.D. (420 nm) bei 0,1 g Zellmasse	O.D. <sub>420</sub> relativ zu <i>Archaeoglobus fulgidus</i> (%)
1	Angereicherte SM1- Archaeen (30%)	0,6	0,3260	0,0543	3,0
2	Gereinigte SM1- Archaeen (60%)	0,1	0,0351	0,0351	1,3
3	0,2 g konzentrierte SM1-Archaeen + 0,1 g <i>Methanococcus igneus</i>	0,3	3,2149	entf.	entf.

**Tab. 32:** Gehalt an Coenzym F<sub>420</sub> angereicherter SM1-Archaeen aus den Perlen des Sippenauer Moores (entf. = entfällt).

### 6.5. Ableitung möglicher Stoffwechselumsätze mittels CTC

Der Farbstoff 5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazoliumchlorid (CTC) wird zum Nachweis stoffwechselaktiver Mikroorganismen eingesetzt. CTC wird dabei zu einem fluoreszierenden Farbstoff reduziert, der als Kristall in die Zellen eingelagert wird und unter UV-Licht leicht nachgewiesen werden kann. Die Anwendung des Farbstoffes an SM1-Archaeen in Ansätzen mit diversen, möglichen Energiequellen sollte Hinweise auf mögliche Substrate für den Stoffwechsel der SM1-Archaeen geben.

#### 6.5.1. CTC-Kontrollen

Nachdem der Farbstoff CTC noch nicht zur Ermittlung von Substraten bisher unkultivierter Mikroorganismen eingesetzt wurde, mussten in Vorversuchen grundlegende Daten über die Physiologie von kultivierbaren Mikroorganismen in Verbindung mit der Reduktion von CTC gewonnen werden. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde während der logarithmischen Wachstumsphase mit dem Lebend/Tot-Farbstoffgemisch LIVE/DEAD® BacLight™ bestimmt (s. II.14.1). Als Testorganismen wurden sowohl die Bakterien *Escherichia coli* K12 und *Lactobacillus casei* spp. shirota (Tab. 33) als auch die Archaeen *Thermococcus celer* und *Methanococcus vanielii* (Tab. 34) eingesetzt. Alle Ansätze wurden in Parallelen durchgeführt, wobei jeweils identische Ergebnisse erhalten wurden. Unter physiologischen



Kultivierungsbedingungen konnte bei Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase, die für die Ansätze verwendet wurden, eine Lebensfähigkeit von mindestens 97% festgestellt werden.

Ansatz-Nr.	Ansätze	Anteil lebender Zellen <sup>1</sup> (%)	Inkubation bei 4°C		Inkubation bei RT	
			2 h	15 h	2 h	15 h
1	<i>Escherichia coli</i> K12 (aerob in LB-Medium)	97	++	++	+++	+++
2	<i>Escherichia coli</i> K12 [5 Monate bei 8°C gelagert] (aerob in LB-Medium)	95	--	--	--	(+)
3	<i>Escherichia coli</i> K12 (anaerob in LB-Medium)	99	(+)	+	+++	+++
4	Kontrolle (LB-Medium)	entf.	--	--	--	--
5	<i>Escherichia coli</i> K12 (in 0,1% NaPP <sub>i</sub> )	20	n.d.	n.d.	--	(+)
6	<i>Escherichia coli</i> K12 (in 0,9% NaCl)	70	--	(+)	+	++
7	<i>Lactobacillus casei</i> spp. shirota (in MRS-Medium)	99	n.d.	n.d.	+++	+++
8	Kontrolle (MRS-Medium)	entf.	n.d.	n.d.	--	--
9	Kontrolle (sterilfiltrierte <i>L. casei</i> spp. shirota-Kultur)	entf.	n.d.	n.d.	--	--

<sup>1</sup> Bestimmung der Lebensfähigkeit mit BacLight (s. II.14.1)

Färbung des Mediums:

-- keine Rotfärbung      (+) schwache Rotfärbung      + deutliche Rotfärbung  
 ++ starke Rotfärbung      +++ sehr starke Rotfärbung      n.d. nicht gemessen  
 entf. entfällt

**Tab. 33:** Reduktion von CTC durch Bakterien in verschiedenen Kontrollansätzen.

In diesen Ansätzen (Tab. 33 und Tab. 34, Ansatz-Nr.1,3,7,10,14) erfolgte bei allen vier getesteten Mikroorganismen schon nach zwei Stunden Inkubation eine makroskopisch erkennbare Rotfärbung des Mediums, was die Reduktion des Farbstoffes CTC und damit Stoffwechselaktivität anzeigte (Tab. 33, Tab. 34). Der Farbstoffumschlag erfolgte bei *Escherichia coli* K12 sowohl bei aerobem als auch bei anaerobem Wachstum bereits nach

zwei Stunden (Tab. 33, Ansatz-Nr. 1,3). Eine längere Inkubation brachte auch nach 15 Stunden keine weitere Veränderung der Medienfärbung. Die Inkubation bei Temperaturen weit unter dem Optimum ging bei allen Organismen mit einer verminderten Reduktion des CTC einher. Dadurch wurde die gleiche Intensität des Farbumschlags erst nach längerer Inkubationszeit erreicht (Tab. 33, Tab. 34).

Die Möglichkeit mittels CTC-Färbung zwischen lebenden, stoffwechselinaktiven bzw. lebenden, stoffwechselaktiven Zellen zu unterscheiden, wurde an Zellen einer Kultur von *Escherichia coli* K12 getestet, die 5 Monate bei 8°C gelagert wurden und noch zu 95% lebensfähig waren (Tab. 33, Ansatz-Nr. 2). Auch bei optimalen Kulturbedingungen in neuem LB-Medium konnte erst nach 15 Stunden Inkubation eine sehr schwache Rotfärbung nachgewiesen werden. Obwohl die eingesetzten Zellen eine ähnlich hohe Lebensfähigkeit wie die logarithmische Kultur von *Escherichia coli* K12 (Tab. 33, Ansatz-Nr. 1) besaßen, konnte bei gleichen Inkubationsbedingungen eine wesentlich geringere Stoffwechselaktivität festgestellt werden.

Ansätze von *Escherichia coli* K12 in 0,9% NaCl-Lösung bzw. 0,1% NaPP<sub>i</sub>-Lösung (Tab. 33, Ansatz-Nr. 5,6) erfolgten, da beide Puffer bereits in Umweltanalysen zum Nachweis unbekannter, stoffwechselaktiver Zellen eingesetzt wurden<sup>203</sup>. Die Verwendung der Puffer ging mit einem erheblichen Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen einher und auch nach 15 Stunden war die Färbung des Mediums deutlich schwächer als bei dem Ansatz auf LB-Medium bei Raumtemperatur (RT).

Desweiteren wurden die anaeroben Archaeen *Thermococcus celer* und *Methanococcus igneus* aerob angesetzt (Tab. 34, Ansatz-Nr. 12,17), wobei auch nach 15 Stunden keine Rotfärbung des Mediums erkennbar war. Sobald stoffwechselaktive Zellen dieser anaeroben Archaeen aus der logarithmischen Wachstumsphase in unphysiologische Bedingungen gebracht wurden, stoppte ohne zeitliche Verzögerung auch die Reduktion des Farbstoffes CTC.

Die Nullkontrollen von LB-Medium und MRS-Medium (Tab. 33, Ansatz-Nr. 3,8) waren auch nach 15-stündiger Inkubation nicht gefärbt. Der Einfluss eines erniedrigten pH-Wertes nach Wachstum von *Lactobacillus casei* spp. shirota auf die Reduktion des CTC wurde durch einen weiteren Versuchsansatz getestet. Die Nullkontrolle mit bewachsenem, sterilfiltrierten MRS-Medium (Tab. 33, Ansatz-Nr. 9) war auch nach 15 Stunden Inkubation nicht gefärbt. Nullkontrollen der reduzierten, anaeroben Medien der getesteten Archaeen zeigten unter dem Einfluss höherer Temperatur eine schwache Rosa- bis Rotfärbung (Tab. 34, Ansatz-Nr. 11,16). Diese wurde mit zunehmender Inkubationsdauer stärker, lag aber immer deutlich unter der Intensität der Färbung positiver Ansätze.

Ansatz-Nr.	Ansätze	Anteil lebender Zellen <sup>1</sup> (%)	Inkubation bei 85°C		Inkubation bei RT	
			2 h	15 h	2 h	15 h
10	<i>Thermococcus celer</i> (anaerob in ½ SME-Medium)	100	+++	+++	+	+++
11	Kontrolle (½ SME-Medium anaerob)	entf.	--	(+)	--	--
12	<i>Thermococcus celer</i> (aerob in ½ SME-Medium)	100 (anaerob)	n.d.	n.d.	--	--
13	Kontrolle (½ SME-Medium, aerob)	entf.	n.d.	n.d.	--	--

Ansatz-Nr.	Ansätze	Anteil lebender Zellen <sup>1</sup> (%)	Inkubation bei 37°C		Inkubation bei RT	
			2 h	15 h	2 h	15 h
15	<i>Methanococcus vanielii</i> (anaerob in DSMZ-Medium Nr. 141)	100	+++	+++	++	+++
16	Kontrolle (DSMZ-Medium Nr. 141, anaerob)	entf.	(+)	+	--	--
17	<i>Methanococcus vanielii</i> (aerob in DSMZ-Medium Nr. 141)	100 (anaerob)	n.d.	n.d.	--	--
18	Kontrolle (DSMZ-Medium Nr. 141, aerob)	entf.	n.d.	n.d.	--	--

<sup>1</sup> Bestimmung der Lebensfähigkeit mit BacLight (s. II.14.1)

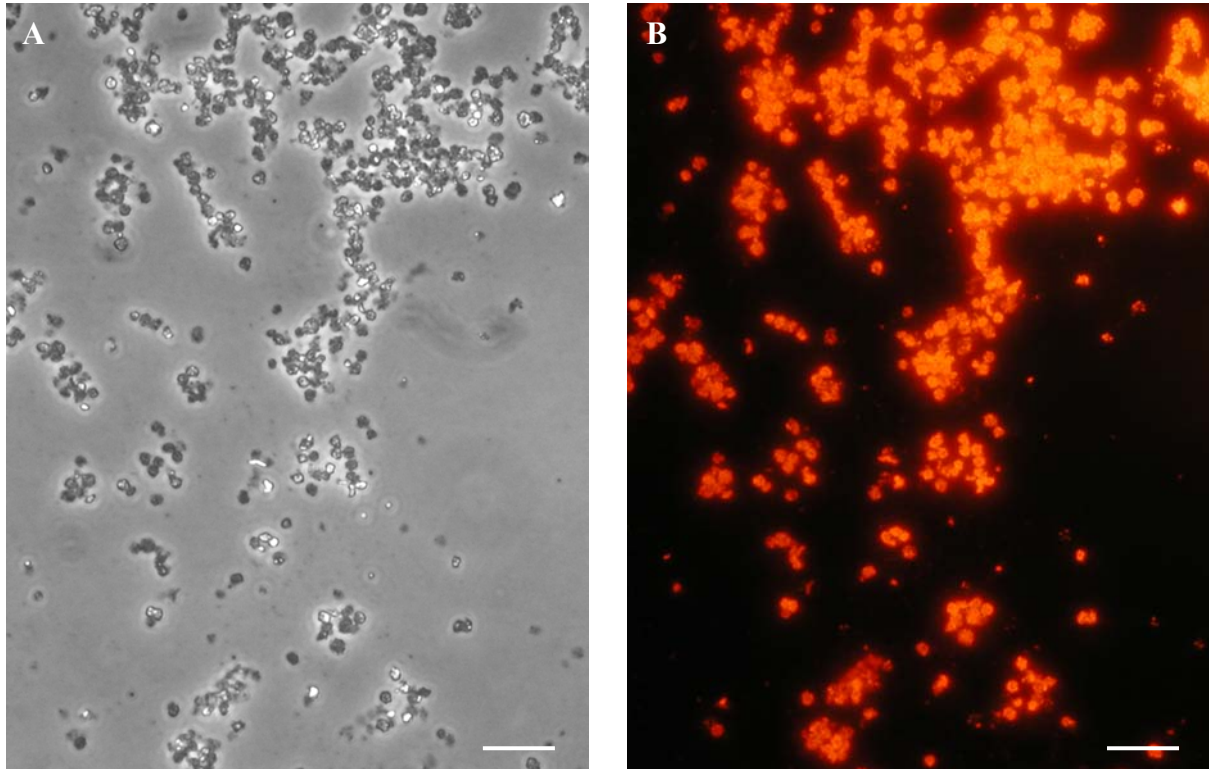
Färbung des Mediums:

-- keine Rotfärbung      (+) schwache Rotfärbung      + deutliche Rotfärbung  
 ++ starke Rotfärbung      +++ sehr starke Rotfärbung      n.d. nicht gemessen  
 entf. entfällt

**Tab. 34:** Reduktion von CTC durch Archaeen in verschiedenen Kontrollansätzen.

Die mikroskopische Kontrolle aller Ansätze ließ erkennen, dass in rot gefärbten Medien die Zellen unter UV-Licht rot fluoreszierten (Abb. 72B). Dabei fiel der Farbstoff CTC nach Reduktion durch Stoffwechselaktivität innerhalb der Zellen aus und bildete Kristalle, die teilweise die ganze Zelle ausfüllten. Große Mengen eingelagerter, reduzierter Farbstoff

konnte die Morphologie von *Escherichia coli* K12 verändern. Die Zellen erschienen dann sehr unförmig und besaßen teilweise den doppelten Durchmesser. Bei Zellen von *Thermococcus celer* konnte bei längerer Inkubation sogar Lyse beobachtet werden.



**Abb. 72:** CTC-gefärbte Zellen von *Thermococcus celer* nach zwei Stunden Inkubation bei 85°C (½ SME-Medium, anaerob). Maßstab: 10 µm.

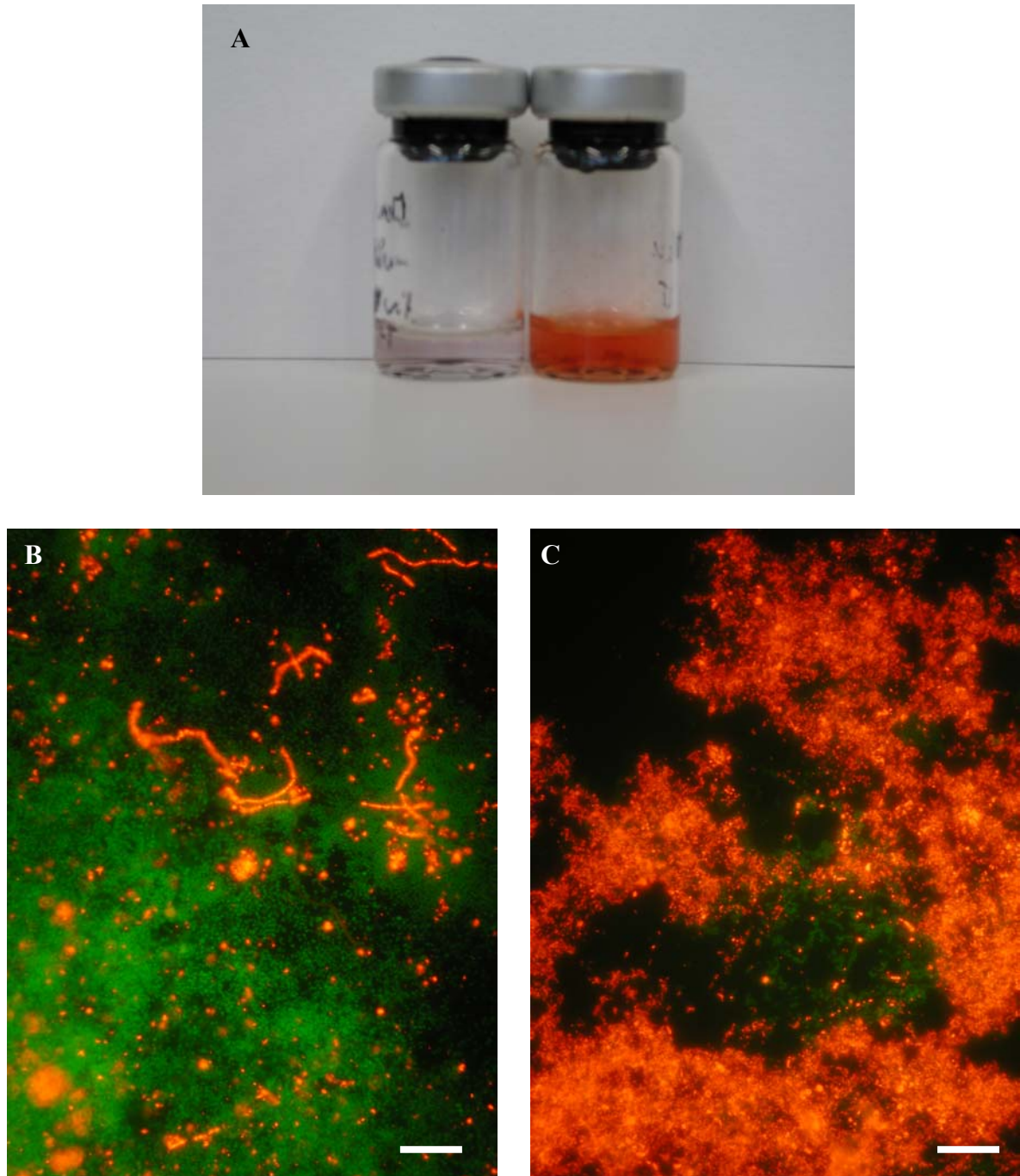
(A) Phasenkontrastaufnahme

(B) Fluoreszenzaufnahme. Stoffwechselaktive Zellen sind rot gefärbt.

#### 6.5.2. Substrate

Der Nachweis der Stoffwechselaktivität nach Zusatz verschiedener Substrate wurde an gallertartigen Ansammlungen von SM1-Archaeen (s. II.7.7) aus der Schwefelquelle am Islinger Mühlbach durchgeführt. Durch FISH mit der SM1-spezifischen Sonde wurde der Anteil der SM1-Archaeen in allen eingesetzten Proben auf über 95% bestimmt. Die Substrat-Ansätze wurden mit und ohne Organik-Zusatz bei unterschiedlichen Gasphasen durchgeführt. Ein CTC-Umschlag war sowohl direkt an der Rotfärbung des Mediums als auch an den roten Einlagerungen in den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen (Abb. 73). Die Färbung der SM1-Zellen wurde durch eine abgewandelte FISH überprüft. Bei dieser Hybridisierung wurde lediglich die Rhodamin Green™ (grüne Fluoreszenz) gekoppelte Sonde ARCH-Mix eingesetzt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erschienen dann die

stoffwechselinaktiven Archaeen grün, während die stoffwechselaktiven durch die CTC-Einlagerung rot gefärbt waren (Abb. 73).



**Abb. 73:** Nachweis der Stoffwechselaktivität gallertartiger Ansammlungen von SM1-Archaeen aus dem Islinger Mühlbach mit CTC-Färbung.

(A) Medien nach CTC-Färbung (links: negativ; rechts: positiv).

(B+C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines CTC-gefärbten Ansatzes nach anschließender FISH mit der Sonde SMARCH714 (grün: SM1-Archaeen ohne CTC-Einschlüsse; rot: Zellen mit CTC-Einschlüssen). Maßstab: 10 µm.

(B) Negativer Nachweis.

(C) Positiver Nachweis.

Tab. 35 gibt sowohl die Medienfärbung als auch die CTC-Färbung der SM1-Archaeen unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation an. In Nullkontrollen der Ansätze ohne Zusatz von SM1-Archaeen wurde sichergestellt, dass CTC nicht chemisch reduziert wurde. Die Medienkontrollen zeigten, dass  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{SO}_3^{2-}$  Ansätze CTC chemisch reduzierten, so dass eine Auswertung dieser Ansätze nicht möglich war. Eine Medienfärbung der Ansätze auf Kohle war aufgrund der Kohlepartikel nicht feststellbar. Während Ansätze auf Fumarat und Stickstoffverbindungen negativ verliefen, konnten schwach positive Nachweise mit verschiedenen Schwefelverbindungen in unterschiedlichen Gasphasen erzielt werden. Ein stark positiver Nachweis der Stoffwechselaktivität wurde mit Extrakt stark schwefelhaltiger, tschechischer Braunkohle (Schwefelgehalt: 4%; H.Huber, pers. Mitt.) erhalten, obwohl eingesetzte Roh-Kohle nur schwache Signale lieferte. Schwefelarme, standortnahe Braunkohle aus der Kohlegrube Dechbetten erreichte weder als Extrakt noch direkt eingesetzt die Signalintensität der tschechischen Braunkohle.



Ansatz	Gasphase N <sub>2</sub>		Gasphase N <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>		Gasphase H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>		Gasphase H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	
	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen	Medium	Zellen
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	(+)	--	(+)	--	--	(×)	(+)	--
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + C <sub>org</sub>	+	(×)	--	--	--	--	--	(×)
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	n.a.
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> + C <sub>org</sub>	+	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	n.a.
S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	--	--	--	--	--	--	--	--
S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> + C <sub>org</sub>	--	×	--	×	--	×	(+)	×
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	--	--	--	(×)	+	×	(+)	--
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> + C <sub>org</sub>	+	(×)	--	(×)	++	×	+	×
S <sup>0</sup>	(+)	--	--	--	--	--	(+)	--
S <sup>0</sup> + C <sub>org</sub>	(+)	--	(+)	(×)	(+)	(×)	+	×
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	--	--	--	--	--	--	--	--
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + C <sub>org</sub>	--	--	--	--	--	--	--	--
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	--	--	--	--	--	--	--	--
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + C <sub>org</sub>	--	--	--	--	--	--	--	--
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	--	--	--	--	--	--	--	--
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + C <sub>org</sub>	--	--	--	--	--	--	--	--
Kohle tschechisch	n.a.	(×)	n.a.	(×)	n.a.	(×)	n.a.	--
Kohle tschechisch + C <sub>org</sub>	n.a.	×	n.a.	×	n.a.	×	n.a.	(×)
Kohleextrakt tschechisch	++	xxx	+++	xxx	+++	xxx	++	xxx
Kohleextrakt tschechisch + C <sub>org</sub>	+++	xxx	+++	xxx	+++	xxx	++	xxx
Kohle Dechbetten	n.a.	--	n.a.	--	n.a.	--	n.a.	--
Kohle Dechbetten + C <sub>org</sub>	n.a.	--	n.a.	(×)	n.a.	(×)	n.a.	--
Kohleextrakt Dechbetten	+	×	+	×	+	×	(+)	(×)
Kohleextrakt Dechbetten + C <sub>org</sub>	+	xx	+	×	+	×	(+)	--
Fumarat	--	--	--	--	--	--	--	--
Fumarat + C <sub>org</sub>	--	--	--	--	--	--	--	--

Färbung des Mediums:

-- keine Rotfärbung

(+) schwache Rotfärbung

+ deutliche Rotfärbung

++ starke Rotfärbung

+++ sehr starke Rotfärbung

n.a. nicht auswertbar

Anteil CTC-gefärbter, kokkenförmiger Zellen:

-- &lt;1%

(×) &lt;5%

× &lt;20%

xx &lt;50%

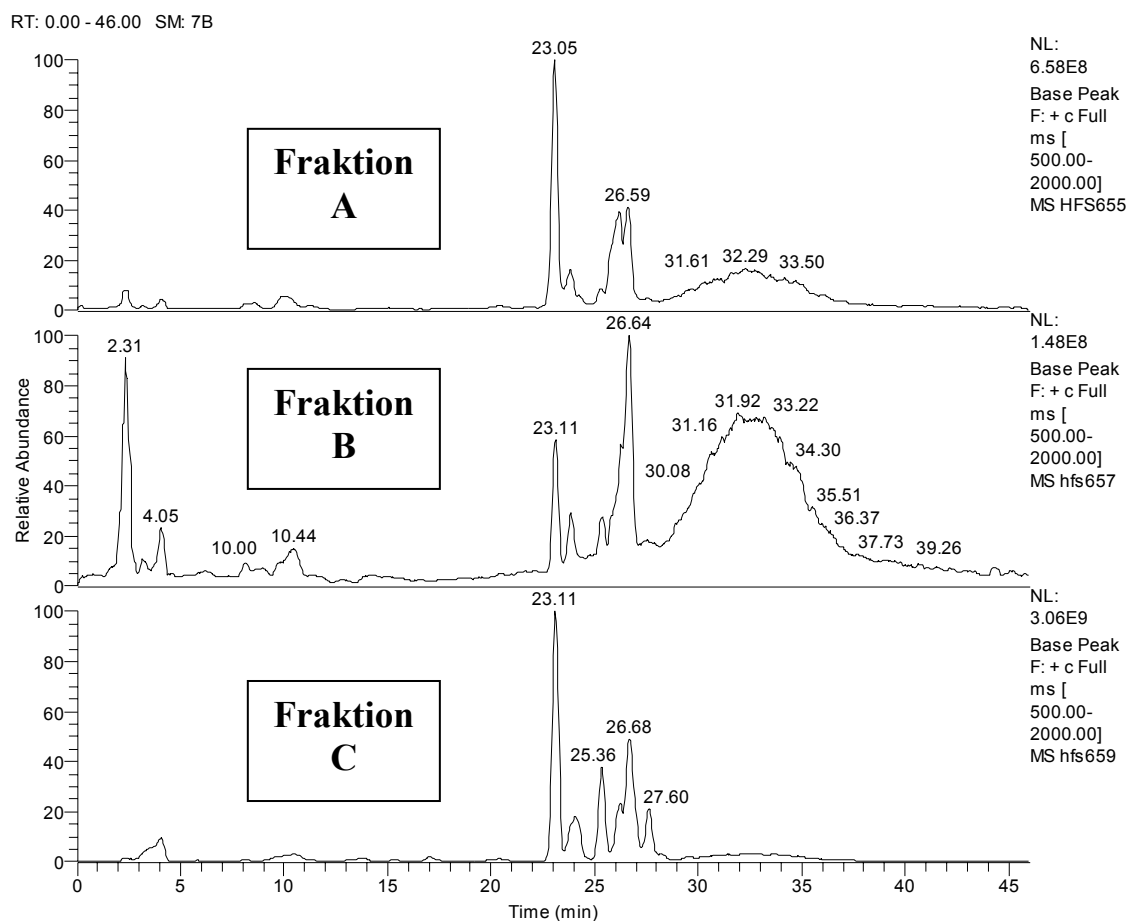
xxx &gt;50%

n.a. nicht auswertbar

**Tab. 35:** Reduktion von CTC durch Zellen des SM1-Archaeons in unterschiedlichen Substraten.

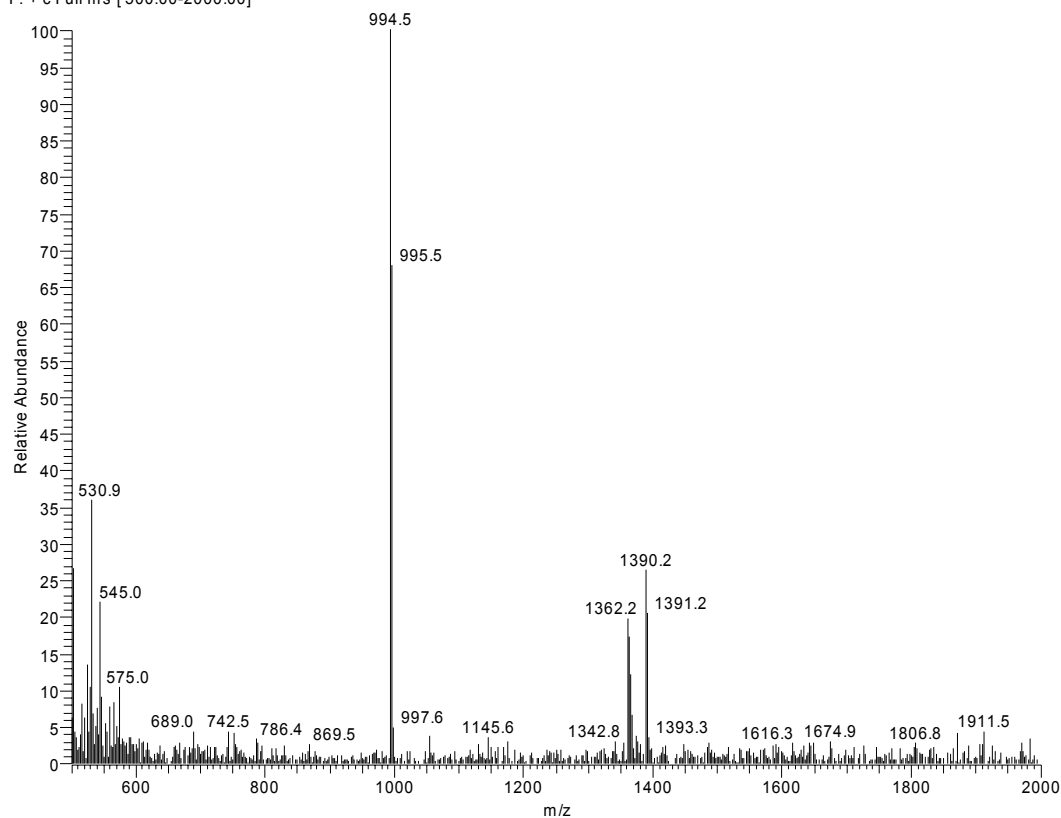
## 7. Lipidanalyse

Die Lipidanalyse erfolgte an Proben aus dem Sippenauer Moor, die einen unterschiedlichen Archaeengehalt aufwiesen (s. II.7.3, II.7.4; Fraktion A, B und C). Dazu wurden Umweltproben ohne Percoll aufgereinigt (s. II.7.6). Die erhaltenen Fraktionen wurden nach den einzelnen Reinigungsschritten durch FISH mit der SM1-spezifischen Sonde SMARCH714 auf ihren Gehalt an SM1-Archaeen überprüft. Fraktion A (s. II.7.3) enthielt 20% SM1-Archaeen, Fraktion B 50% und Fraktion C >98%. Alle Fraktionen wurden lyophilisiert und nach einer anschließenden Lipidextraktion analysiert (s. II.19). In den LC-Chromatogrammen erkennt man eine Vielzahl von Peaks, die von Lipiden oder Substanzen mit ähnlichem Verhalten verursacht werden. Vergleicht man die LC-Chromatogramme der einzelnen Fraktionen (Abb. 74), so erkennt man einen mit dem Archaeenanteil steigenden Peak bei 25,3 min. Aufgrund des Molekulargewichtes (MW) von 994 g/mol im Massenspektrometer (Abb. 75) wurde es als Diglycoarchaeol identifiziert. Die Peaks bei MW 1362 – 1390 deuten auf die gemeinsame Elution mit einem weiteren, unbekannten Lipid hin.



**Abb. 74:** Vergleich der LC-Chromatogramme der Lipidextrakte aus den Fraktionen A, B und C von der Aufreinigung der SM1-Archaeen aus dem Sippenauer Moor.

HFS657 #1191 RT: 25.34 AV: 1 NL: 5.67E7  
F: + c Full ms [500.00-2000.00]



**Abb. 75:** Massenspektrometrie des mit dem SM1-Archaeengehalt steigenden Peaks im LC-Chromatogramm bei 25,3 min.

## IV. Diskussion

Bis vor etwa 10 Jahren wurde angenommen, dass sich die Domäne der *Archaea* nur aus extremophilen Mikroorganismen wie Methanogenen, Halophilen und Hyperthermophilen zusammensetzt<sup>168,202</sup>. Allerdings konnte in den letzten Jahren durch molekulare Analysen verschiedener Biotope ihre Verbreitung auch in gemäßigten bis kalten Biotopen gezeigt werden<sup>43,91</sup>. Im Gegensatz zu der Vielzahl an phylogenetischen Nachweisen gelang es hierbei nur wenige Male, die Verteilung dieser unkultivierten Organismen im Biotop zu erfassen<sup>88,161</sup>. Bisher ist es erst in zwei Fällen gelungen, stabile Populationen dieser unkultivierten Archaeen aufzufinden. Während in einem marinen Schwamm der Gattung *Axinella* das Crenarchaeum *Cenarchaeum symbiosum* nachgewiesen werden konnte<sup>138</sup>, wurde vor kurzem in einem Konsortium, das anaerobe Methanoxidation betreibt, erstmals ein unkultivierter Vertreter der Euryarchaeota reproduzierbar nachgewiesen<sup>21</sup>.

In dieser Arbeit konnten charakteristische, makroskopisch sichtbare mikrobielle Zellverbände, deren Aussehen Perlenketten glichen, in den Schwefelquellen des Sippenauer Moores bei Saal a. d. Donau aufgefunden werden. Mit einer Kombination aus Beobachtungen im Biotop, Phasenkontrastmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde der Aufbau dieser ungewöhnlichen Strukturen in wesentlichen Punkten aufgeklärt. Es konnten hierbei zwei Gruppen von Mikroorganismen identifiziert werden, aus denen sich die Perlenketten hauptsächlich zusammensetzen.

Eine dieser zwei dominanten Gruppen besteht aus filamentösen Bakterien mit stellenweise häufigen, lichtbrechenden Einschlüssen. Sie stellen zum einen den Hauptbestandteil des Fadens dar, der die einzelnen Perlen untereinander verbindet, und sind zum anderen am Aufbau des äußeren, weißen Teils der Perlen maßgeblich beteiligt. Die weißliche Färbung der Perlenketten könnte durch elementaren Schwefel verursacht werden, der durch den Sulfid-oxidierenden Stoffwechsel dieser filamentösen Bakterien gebildet wird. Die unter dem Mikroskop auffälligen, lichtbrechenden Einschlüsse wären demzufolge stoffwechselbedingte Schwefeleinlagerungen<sup>19</sup>. In weiteren Untersuchungen konnten diese filamentösen Bakterien hauptsächlich einem bisher unbekannten Vertreter der Gattung *Thiothrix* zugeordnet werden<sup>118,119</sup>, die schon vor über 100 Jahren an kalten Schwefelquellen nachgewiesen wurden<sup>144,197</sup>.

In diesem Zusammenhang wurde auch ein vor 1865 von Ludovico Rabenhorst angelegtes Exsiccata<sup>143</sup> mit Biomasse von *Leptonema nivea* (frühere Bezeichnung von *Thiothrix nivea*) im Archiv der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft wieder entdeckt, das bisher nirgendwo bibliographisch erfasst war. Die über 100 Jahre alten, getrockneten Zellmassen

weißer Beläge aus einer kalten Schwefelquelle des Berner Oberlandes stehen dadurch für vergleichende Analysen zur Verfügung. Besonders interessant wäre hierbei die bakterielle und archaeelle Zusammensetzung der alten Biomatten mit heutigen Populationen durch phylogenetische Analysen zu vergleichen.

Das Innere der Perlen wird von einer neuen Gruppe Archaeen dominiert, die in den bakteriellen Filamentbildnern Mikrokolonien bilden. Unter dem Lichtmikroskop zeigen sie eine regelmäßige, kokkenförmige Morphologie mit einem Zelldurchmesser von ca. 0,6 µm. Betrachtet man allerdings eine Probe im Phasenkontrast nach einer FISH, erscheint ein Großteil der Zellen „hantelförmig“. Aus diesem Grund wurde in Voruntersuchungen undefinierter Biomatten von „hantelförmigen“ Archaeen berichtet, die vereinzelt in den weißen, flotierenden Streamern des Sippenauer Moores aufgefunden werden konnten<sup>153</sup>. In weiteren Untersuchungen ließen sich die Kokken der Mikrokolonien durch positive Hybridisierungssignale mit der *Euryarchaeota*-spezifischen Sonde EURY498 den *Euryarchaeota* zuordnen. Interessanterweise sind die archaeellen Zellen einer Mikrokolonie in ein Polymer mit bisher unbekannter, chemischer Zusammensetzung eingebettet, was besonders deutlich durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte. Ihre dreidimensionale Anordnung wird durch einen definierten Zell-Zell-Abstand geprägt. Obwohl der Ursprung dieses Polymers bislang nicht eindeutig belegt werden konnte, ist aufgrund des auffälligen Aufbaus der archaeellen Mikrokolonie eine Polymerproduktion der *Archaea* während ihres Wachstums am wahrscheinlichsten. Die Biosynthese von Polymeren unterschiedlicher Zusammensetzung wurde bereits bei einer Vielzahl natürlicher, bakterieller Biofilme beobachtet, konnte aber bisher noch nicht für Mitglieder der archaeellen Domäne in der Natur beschrieben werden<sup>72,37</sup>. Die biologische Funktion des Polymers ist unbekannt, aber es könnte eine wichtige Funktion bei der Ausprägung und dem Erhalt der Perlenstruktur in der Natur einnehmen. Eine funktionelle Bedeutung bei der Nährstoffversorgung bzw. beim Abtransport von toxischen Stoffwechselprodukten<sup>41</sup>, wie sie bereits für dünne Wasserkanälchen in Mikrokolonien von unkultivierten, nitrit-oxidierenden Bakterien angenommen wurde<sup>40</sup>, wäre ebenfalls denkbar. Allerdings wurden diese Poren und Kanälchen bisher an FISH-gefärbten Präparaten<sup>40</sup> oder elektronenmikroskopisch beobachtet<sup>112</sup>, wodurch Präparationsartefakte nicht ausgeschlossen werden können. Im Fall des SM1-Archaeons aus dem Sippenauer Moor konnten die elektronenmikroskopischen Daten auch im Phasenkontrastmikroskop ohne chemische Vorbehandlungen bestätigt werden. Hierbei besitzt jede einzelne SM1-Zelle zu der nächsten einen Abstand des 1-1,5fachen Zelldurchmessers. Die starke Ausprägung dieser zellfreien Räume spiegelt das Verhältnis des Volumens der

SM1-Zellen zum Volumen der zellfreien Abstände von ca. 1:15 wieder. Viele Kanälchen mit großem Gesamtvolumen können die Nährstoffversorgung verbessern und reduzieren in einem Biofilm die Zonen mit Substraterschöpfung, was schnell wachsende Mikroorganismen bevorteilt <sup>150</sup>. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den SM1-Archaeen in den Perlenketten um schnell wachsende Organismen mit einem hohen Stoffumsatz handelt, die durch die weiten Zell/Zell-Abstände ihre Nährstoffversorgung stark verbessern.

In einer Perle bilden die SM1-Archaeen mit den bakteriellen Filamentbildnern der Gattung *Thiothrix* über einen längeren Zeitraum eine stabile Assoziation. Das konstante Wiederauffinden dieser Assoziationen in den Perlenketten lässt spezifische Wechselbeziehungen der beiden Partner vermuten <sup>22</sup>. Dabei könnten die bakteriellen, filamentösen Partner optimale Wachstumsbedingungen für die archaeellen Kokken schaffen, Stoffwechselendprodukte als Substrat bereitstellen <sup>41</sup> oder sogar eine Zell-Zell-Kommunikation mittels Botenstoffen bestreiten <sup>117</sup>.

Die Beobachtungen an den Perlenketten legen den Schluss nahe, dass es sich bei den SM1-Archaeen um Organismen handelt, die einen Lebenszyklus mit sessilen und motilen Formen ausbilden <sup>126</sup>. Das Wachstum einzelner Perlen (bis zu ca. 8 mm Durchmesser) geht hierbei einher mit der Besiedlung des Perleninneren durch eine Vielzahl morphologisch unterschiedlicher Bakterien, während die Anzahl des SM1-Archaeons abnimmt. In diesem Stadium zerplatzen die Perlen bei der Probenentnahme leicht und kleine Gasbläschen werden freigesetzt. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das strukturgebende, die SM1-Archaeen umhüllende Polymer von den sekundären Perlenbewohnern unter Gasbildung abgebaut wurde. Ein entsprechender Vertreter könnte das Isolat SG darstellen, der in diesem Stadium in größerer Zellzahl im Perleninneren nachgewiesen wurde <sup>95</sup>. Aus der Polymermatrix kann zu diesem Zeitpunkt eine Freisetzung der eingeschlossenen Archaeen erfolgen. Mit der Anheftung von Einzelzellen oder kleineren Zellverbänden der SM1-Archaeen an die bakteriellen Filamentbildner im natürlichen Lebensraum könnte anschließend die Bildung einer neuen Perlenkette ausgelöst werden.

Der Nachweis dieser stabilen Lebensgemeinschaft von unkultivierten Archaeen und bakteriellen Filamentbildnern konnte über einen Zeitraum von 30 Monaten durch eine Kombination molekularbiologischer Methoden erbracht werden. So wurden in einer phylogenetischen Analyse der archaeellen 16S rRNA-Gensequenzen einer Perle nur Sequenzklone mit identischer Basenfolge identifiziert, die der Sequenz des SM1-Archaeons entspricht. Diese Klonsequenz zeigt keine nahe Verwandtschaft zu 16S rRNA-Gensequenzen kultivierter Mikroorganismen oder Sequenzen aus Umweltproben. Im 16S rRNA Stammbaum



bildet die SM1-Sequenz einen tiefen phylogenetischen Abzweig zu der nächstverwandten Ordnung der *Thermoplasmatales* (siehe Abb. 68). Mit einem phylogenetischen Abstand von über 20% zu dem nächstverwandten, kultivierten Vertreter *Thermoplasma acidophilum* bildet das SM1-Archaeon innerhalb der *Euryarchaeota* eine neue taxonomische Gruppe mindestens auf Familienniveau, wenn nicht sogar auf der Ebene einer neuen Ordnung. Obwohl das Fehlen nah verwandter Gensequenzen und große Evolutionsdistanzen häufig mit instabilen Baumtopologien einhergeht<sup>80</sup>, konnten bei der Bestimmung der phylogenetischen Position des SM1-Archaeons mit verschiedenen Baumrekonstruktionsmethoden nur geringe Abweichungen festgestellt werden. Der relativ niedrige G+C-Gehalt von 52 mol% dieser 16S rRNA-Gensequenz deutet auf eine Aktivität des SM1-Archaeons bei niedrigen Temperaturen hin<sup>200</sup>, wie sie auch in den kalten Schwefelquellen des Sippenauer Moores vorzufinden sind. Allerdings können durch die Klonhäufigkeiten in einer phylogenetischen Analyse keine gesicherten Rückschlüsse auf die tatsächlich im Biotop vorliegenden Häufigkeiten der Organismen gezogen werden. Neben der Wahl der Primer, die zur bevorzugten Amplifikation bzw. Diskriminierung von bestimmten 16S rRNA-Genen in einer Mischung führen können<sup>148,179</sup>, hat auch die Anzahl der 16S rRNA-Operone im Genom eines Organismus einen großen Einfluss. So lieferte ein Genom mit mehreren rRNA-Operonen in einer PCR ungleich mehr Produkte als ein Organismus mit nur einem Operon<sup>55</sup>.

Im Fall des SM1-Archaeons aus den Perlen des Sippenauer Moores konnte die 16S rRNA Gensequenz durch FISH-Analysen mit der neu konstruierten, hochspezifischen Sonde SMARCH714 den Kokken in den Perlen zugeordnet werden. Die Spezifität der Sonde wurde dadurch erreicht, dass sie zu allen bisher bekannten und in Datenbanken hinterlegten 16S-rRNA Gensequenzen mindestens drei Basenaustausche enthält, obwohl bei manchen Sonden schon durch einen Basenaustausch eine FISH-Färbung verhindert wird<sup>39</sup>. Zudem konnte in FISH-Kontrollexperimenten gezeigt werden, dass ausschließlich die Kokken in den Mikrokolonien der Perlenketten aus dem Sippenauer Moor färbten. Allerdings ist es durchaus kritisch, phylogenetische Aussagen über unkultivierte Mikroorganismen mittels FISH zu treffen. Die Einstellung der geeigneten Hybridisierungsbedingungen und eine Spezifitätskontrolle an diesen Ziel- bzw. Kontrollorganismen sind nicht möglich, wodurch es zu Fehlinterpretationen kommen kann. Neben dem Ribosomengehalt<sup>9</sup> können auch die Zugänglichkeit der 16S rRNA für Gensonden<sup>62</sup> und sogar gespleißte, zirkularisierte Intron-RNA<sup>2</sup> die Hybridisierungsergebnisse beeinflussen. So wurde ein unkultivierter, stäbchenförmiger Mikroorganismus durch den Einsatz verschiedenster, für die 16S rRNA-Sequenz der *Korarchaeota* spezifischer Gensonden als Vertreter dieses Reiches beschrieben,

von dem bisher noch kein Organismus kultiviert werden konnte <sup>29</sup>. In einer nachfolgenden Arbeit konnte durch Kultivierung und Aufklärung der Sondenfehlbindungen gezeigt werden, dass es sich bei diesem Archaeum nicht um einen Vertreter der *Korarchaeota*, sondern um *Crenarchaeota* der Gattung *Pyrobaculum* handelt <sup>2</sup>.

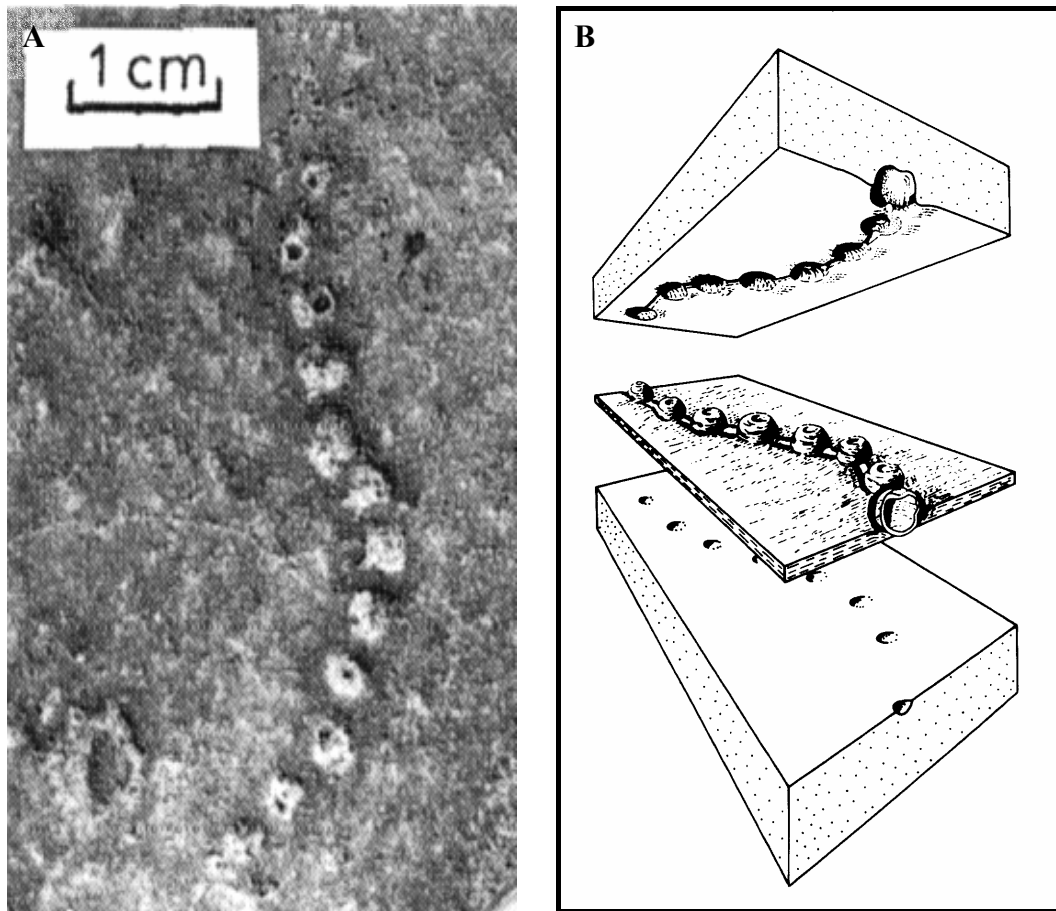
Um das rRNA-Konzept <sup>9</sup> auch für unkultivierte Mikroorganismen mit großem phylogenetischen Abstand erfolgreich anwenden zu können, müssen deshalb zwei Voraussetzungen gegeben sein: Die Universalität der eingesetzten Sonden für die gewünschte Mikroorganismengruppe und eine Möglichkeit der sondenunabhängigen Überprüfung der phylogenetische Position FISH-gefärbter Mikroorganismen. Obwohl z.B. die Gensonde EUB338 als universell für alle Bakterien beschrieben wurde <sup>6</sup> und immer noch standardmäßig eingesetzt wird <sup>125</sup>, konnte gezeigt werden, dass damit ganze bakterielle Ordnungen in FISH-Analysen nicht nachweisbar sind <sup>39</sup>. Aus diesem Grund wurde auch für den Nachweis unkultivierter Archaeen ein Sondengemisch (ARCH-Mix) konzipiert, bei welchem Sequenzen archaeenspezifischer, universeller PCR-Primer die Grundlage darstellen. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, dass mit diesem Sondengemisch nahezu alle bekannten, archaeellen Sequenzen mit zumindest einer fehlerfrei bindenden Sonde nachgewiesen werden könnten.

Um Fehlinterpretationen bei FISH-Färbungen zu vermeiden <sup>2</sup>, sollte in einer Umweltprobe bei einem positiven Hybridisierungssignal unbekannter Mikroorganismen die korrekte Sondenbindung überprüft werden. Hierfür bietet sich der Einsatz eines Laserkatapults an, das in der Pathologie schon häufig zur Gewebevereinzeln eingesetzt wird <sup>57,58</sup>. Dazu wird die Zellsuspension auf einer dünnen Trägerfolie aufgebracht, unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, die Folie um die erwünschten Zellen mittels Laser geschnitten und der abgetrennte Bereich über das Laserkatapult vereinzelt. Anschließend kann die phylogenetische Position dieser Zellen auf DNA-Ebene über eine Einzelzell-PCR ermittelt werden <sup>205</sup>. Um diese abschließende PCR nicht negativ zu beeinflussen, mussten allerdings bei der Hybridisierung neu konstruierte und speziell modifizierte Sonden eingesetzt werden.

Untersuchungen zum Vorkommen und der Verbreitung in 24 bayerischen Schwefelquellen sollten die ökologische Relevanz der Perlenketten bzw. der darin eingebetteten, neuartigen SM1-Archaeen in den kalten Schwefelquellen zeigen. Allerdings stellte sich im Laufe der Suche nach geeigneten Probenahmeorten heraus, dass diese Quellen in ihrer Existenz größtenteils stark bedroht sind. Viele Schwefelquellen sind zur Nutzung als Kurbad gefasst worden und fließen nicht mehr natürlich ab, andere wurden nicht zuletzt aufgrund ihres übelriechenden Wassers verfüllt oder überbaut, wie die Quelle am Gudi-Berg bei Garmisch-

Partenkirchen, die 1936 durch den Bau der Olympiaschanze stark beeinträchtigt wurde<sup>1</sup>. Von den seit langer Zeit beschriebenen und katalogisierten Schwefelquellen<sup>33,67</sup> befinden sich nur noch wenige in ihrem ursprünglichen Zustand. Die bayerischen Schwefelquellen treten hauptsächlich in Südbayern zutage<sup>1,142</sup> und lassen sich dort schwerpunktmäßig zu drei Gebieten zusammenfassen: Raum Regensburg, Raum Passau und Raum Garmisch-Partenkirchen. Das Vorkommen von anteilmäßig wenigen Archaeen (<<0,1% der Gesamtzellzahl) konnte durch FISH-Analysen für eine Vielzahl der untersuchten Schwefelquellen gezeigt werden. Mit der SM1-spezifischen Sonde konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um SM1-Archaeen handelt, wie sie in den Perlenketten zu finden sind. Perlenkettenstrukturen mit dem typischen Aufbau, wie sie in drei Schwefelquellen des Sippenauer Moores gefunden wurden, konnten zusätzlich noch an einer weiteren Schwefelquelle im Raum Regensburg (Islinger Mühlbach) festgestellt werden. Die positiven Hybridisierungen mit der SM1-Archaeon-spezifischen Sonde in Verbindung mit einer phylogenetischen Analyse einer einzelnen Perle lassen den Schluss zu, dass es sich bei den in die bakteriellen Filamente eingebetteten Archaeen um das SM1-Archaeon handelt. Der Aufbau der Perlenketten der Schwefelquelle am Islinger Mühlbach ist somit vergleichbar mit dem der Perlenketten des Sippenauer Moores.

Phylogenetische Analysen von fünf bayerischen Schwefelquellen, die keine Perlenketten enthielten, zeigten das Vorkommen von Archaeen in allen untersuchten Quellen (s. III.4.3.2). Neben Klonsequenzen mit naher Verwandtschaft zu bereits kultivierten methanogenen Archaeen konnten interessanterweise in allen Schwefelquellen Vertreter einer neuen SM1-Sequenzgruppe identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Klonsequenzen, die mit dem SM1-Archaeon der Perlenketten innerhalb der *Euryarchaeota* ein Sequenzkluster bilden, aber zueinander größtenteils phylogenetische Abstände mindestens auf Gattungsebene besitzen. Besonders interessant ist auch die Tatsache, dass die wenigen, bereits bekannten Sequenzen mit näherer Verwandtschaft oft in schwefelwasserstoffhaltiger Umgebung in verschiedenen Regionen der Welt nachgewiesen wurden (schwefelhaltige Seen<sup>34</sup>, Reisfelder<sup>70</sup>). Die weite Verbreitung dieser SM1-Gruppe in verschiedensten Schwefelquellen konnte durch den Nachweis mehrerer Vertreter in einer warmen, marinen Schwefelquelle (37°C) in der Türkei unterstrichen werden. Unkultivierte Vertreter der *Crenarchaeota* wurden dagegen nur in einer Schwefelquelle (Pilzweg) nachgewiesen. Dort machten sie allerdings den überwiegenden Anteil der Klone aus.



**Abb. 76:** Mikrofossilien in Perlenkettenform aus dem Bangemall Basin, West-Australien. (Abbildungen aus Grey und Williams, 1990<sup>68</sup>.  
 (A) Fotografie einer fossilen Perlenkette.  
 (B) Modell einer fossilen Perlenkette.

Neben der geographischen Verbreitung der Perlenketten kann auch eine mögliche erdzeitgeschichtliche Verbreitung vermutet werden. So wurden Mikrofossilien in Perlenkettenform ähnlicher Größe in 1,1 Milliarden Jahre alten Gesteinsschichten des Bangemall Basins, Nordwest-Australien und in der 1,3 Milliarden Jahre alten Appekunny Formation, USA entdeckt<sup>68,78</sup>. Der Aufbau einzelner Perlenketten mit einer Länge von 1 – 7 cm, in deren Verlauf 3 bis 30 Perlen regelmäßig angeordnet sind (Abb. 76), erinnert stark an die nativen Perlenketten in den Schwefelquellen des Sippenauer Moores (siehe Abb. 8, 13). Auch der Durchmesser einzelner, fossiler Perlen (1 – 3 mm) und ihr Abstand zueinander liegen in der Größenordnung der rezenten Perlen aus dem Sippenauer Moor. Aufgrund der Morphologie wurde angenommen, dass es sich dabei um fossile Formen von Braunalgen handelt<sup>68</sup>. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine fossile Form der neuentdeckten, aus Prokaryonten aufgebauten Perlenketten sulfidhaltiger Quellen handelt. Gestützt wird diese Vermutung durch Funde von Mikrofossilien prokaryontischer Filamente mit eingeschlossenen Mikrokolonien kokkenförmiger Organismen in ähnlich alten

Gesteinsschichten (1,0-1.625 Milliarden Jahre) derselben Region (Bangemall Gruppe, Nordwest-Australien) in der auch die fossilen Perlenketten nachgewiesen wurden<sup>28</sup>.

Die Entdeckung filamentöser Mikroorganismen in 3,235 Milliarden Jahre alten Ablagerungen reduzierter Schwefelverbindungen (Pyrit, Sphalerit etc.) vulkanischen Ursprungs bei Pilbara Craton, Nordwest-Australien unweit der Fundstätte der fossilen Perlenketten, sowie deren Interpretation als prokaryontische, hyperthermophile, chemotrophe Mikroorganismen, deutet auf eine frühe Entwicklung filamentöser Mikroorganismen in schwefelhaltigen Biotopen hin. Möglicherweise entstanden in Hydrothermalsystemen hyperthermophile, prokaryontische Vorstufen der rezenten Perlenketten schon zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung des Lebens auf der Erde. Eine gezielte Suche nach derartigen mikrobiellen Strukturen in den Biomatten filamentöser Mikroorganismen (z.B. der Gattung *Beggiatoa*<sup>71</sup>) an marinen Hydrothermalsystemen (z.B. der Tiefsee) könnte Aufschlüsse über rezente Formen von Perlenketten in diesen Biotopen liefern.

Vergleichende Wasseranalysen von ausgewählten Schwefelquellen, die auch bezüglich ihrer mikrobiellen Zusammensetzung untersucht wurden, zeigten mit Ausnahme des Sulfidgehaltes lediglich geringe Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung. Der Chemismus der Wässer entsprach weitgehend dem Mittelwert aus 15 analysierten Schwefelquellen am Donaurand<sup>17</sup>. Während in den Schwefelquellen des Sippenauer Moores und im Islinger Mühlbach Perlenketten identifiziert wurden, konnte dieser Nachweis für die Quellen in Irnsing und in Teugn trotz intensiver Suche bisher nicht erbracht werden. Obwohl die Schwefelquelle in Teugn geographisch dem Sippenauer Moor am nächsten liegt, weist sie mit 3 mg/l den höchsten Sulfidgehalt der analysierten Schwefelquellen auf. Eine direkte Korrelation des Sulfidgehaltes mit dem Vorkommen der Perlenketten lässt sich jedoch nicht herstellen, da in Irnsing ähnliche Sulfidkonzentrationen wie am Islinger Mühlbach nachgewiesen werden konnten.

Weitere Analysen erfolgten im Mikrohabitat Perle in direkter Umgebung der SM1-Archaeen mit Hilfe von Optoden. Damit war es möglich im Inneren der Perlenketten einen schwachsauren pH-Wert (6,6) nachzuweisen, während das umgebende Quellwasser einen schwach alkalischen pH-Wert von 7,4 aufweist. Ebenfalls konnten Hinweise auf einen geringen Sauerstoffgehalt im Inneren der Perlen erhalten werden, was auf einen mikroaerophilen oder anaeroben Stoffwechsel hindeutet.

Durch die charakteristische und makroskopisch sichtbare Struktur der Perlenketten aus dem Sippenauer Moor wird ein einfaches Wiederfinden der unkultivierten SM1-Archaeen ermöglicht. Eine anschließende Reinigung der SM1-Zellen über Dichtegradienten-

zentrifugation mit Hilfe eines Percoll-Gradienten bis zu einem Reinheitsgrad von >98% (C. Moissl, pers. Mitt.) erlaubte erste molekulare und biochemische Untersuchungen. Durch ein modifiziertes Protokoll konnte die Reinigung auch ohne das für viele Versuche störende Percoll durchgeführt werden. Allerdings zeigen neuere Arbeiten an den Schwefelquellen des Sippenauer Moores und des Islinger Mühlbaches, dass sogar freilebende SM1-Archaeen in großen, gallertartigen Aggregaten an die Oberfläche gespült werden und an Polyethylenetzen aufgefangen werden können<sup>74</sup>. Auch diese Aggregate besitzen einen Reinheitsgrad von 90-95%<sup>74</sup>, der durch einen Reinigungsschritt sogar noch weiter gesteigert werden kann. Aufgrund der hohen Lebensfähigkeit der SM1-Archaeen in diesen gallertartigen Aggregaten und in den hochreinen Fraktionen konnten diese für weitere physiologische Untersuchungen eingesetzt werden.

Bezugnehmend auf die phylogenetische Position des SM1-Archaeons und Beobachtungen im (Mikro-) Habitat, könnten zwei mögliche Stoffwechselwege für das SM1-Archaeon postuliert werden<sup>153</sup>. Es wäre denkbar, dass die Archaeen im anaeroben Milieu im Perleninneren einerseits Methanogenese betreiben oder andererseits das durch den sulfidoxidierenden Partner *Thiothrix* bereitgestellte Sulfat durch Sulfatreduktion verstoffwechseln. Alle sulfatreduzierenden Mikroorganismen, *Bacteria* und *Archaea*, besitzen hierfür mit der Sulfitreduktase das gleiche Schlüsselenzym<sup>183</sup>. Aufgrund der starken Konservierung dieses Gens können sowohl archaeelle als auch bakterielle Sulfitreduktasen durch PCR mit einem spezifischen Primerpaar nachgewiesen werden<sup>183</sup>. Weder in Proben der gallertartigen Aggregate noch in hochreinen Fraktionen der SM1-Archaeen konnte eine archaeelle Sulfitreduktase nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass das SM1-Archaeon entweder keine Sulfatreduktion durchführt oder falls doch, keine „konventionelle“ Sulfitreduktase besitzt.

Die Untersuchungen zum methanogenen Stoffwechsel beinhalteten eine Methanmessung der Gasphase in „älteren“ Perlen (Ø ca. 8 mm) und die Bestimmung des bei allen bekannten Methanogenen nachgewiesenen Coenzym F<sub>420</sub>. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Methananteil an der Gasphase in „älteren“ Perlen ungefähr siebenmal niedriger war als bei einem methanogenen Stoffwechsel mindestens zu erwarten wäre. Dieses Ergebnis spricht gegen einen methanogenen Stoffwechsel der SM1-Archaeen. Dies wurde durch die Quantifizierung des Coenzym F<sub>420</sub> aus den Zellmassen bestätigt, in welchen maximal 3% des Gehaltes von *Archaeoglobus fulgidus* nachgewiesen werden konnte. Bei *A. fulgidus* handelt es sich um einen Sulfatreduzierer, der das Coenzym F<sub>420</sub> für die Oxidation von Laktat benötigt ohne den typischen methanogenen Stoffwechsel zu besitzen<sup>206</sup>. Der Gehalt an Coenzym F<sub>420</sub>



dieses Organismus stellt somit die untere Grenze dar, die bei der Annahme eines methanogenen Stoffwechsels überschritten werden müsste. Aus den Ergebnissen der Methanmessung und der Quantifizierung des Coenzym F<sub>420</sub> kann geschlossen werden, dass es sich bei dem Stoffwechsel der SM1-Archaeen nicht um Methanogenese handelt.

Zur weiteren Aufklärung des Stoffwechsels unkultivierter Mikroorganismen wurde als neues Werkzeug eine Färbung durch den Fluoreszenzfarbstoff 5-Cyano-2,3-ditolyl Tetrazoliumchlorid (CTC) ausgearbeitet. Dieser wurde bisher hauptsächlich in Umweltproben zur Unterscheidung zwischen lebenden, stoffwechselaktiven und lebenden, stoffwechselinaktiven Zellen verwendet<sup>16,203</sup>. Dabei wird das farblose CTC bei *Escherichia coli* durch Succinat- bzw. NAD(P)H-Dehydrogenasen reduziert<sup>162</sup>, wobei sich ein rot fluoreszierender Kristall im Zellinneren bildet, der fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die Stärke dieser Reaktion ist von der Anzahl der zellulären Elektronentransportvorgänge abhängig und stoppt nahezu sofort nach Überführung der Zellen in unphysiologische Bedingungen. Allerdings zeigte sich am Beispiel von *Lactobacillus casei* spp. shirota, dass auch Mikroorganismen mit gärendem Stoffwechsel zur Reduktion des Farbstoffes fähig sind. Dies steht im Einklang mit dem Nachweis eines respiratorischen Metabolismus, den *Lactobacillus lactis* unter bestimmten Vorraussetzungen bestreitet<sup>51,65</sup>. Die Färbbarkeit von anaeroben Archaeen wurde erstmalig für *Methanococcus vanielii* und *Thermococcus celer* gezeigt (s. Tab. 34; Abb. 72). Zur gezielten Suche nach Stoffwechselfunktionen unkultivierter Archaeen wurde der Farbstoff CTC zum ersten Mal an dem SM1-Archaeon eingesetzt, um deren Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Substrate in unterschiedlichen Gasphasen nachzuweisen. Bei Schwefelverbindungen in unterschiedlichen Gasphasen erfolgte eine schwache Aktivierung der SM1-Archaeen, die oft durch Zugabe von organischen Komponenten gesteigert werden konnte. Besonders interessant ist hierbei, dass die Stoffwechselaktivität der SM1-Archaeen auf den Schwefelsubstraten Tetrathionat und Thiosulfat besonders stark ausgeprägt ist, die als Stoffwechselprodukte von Vertretern der Gattung *Thiothrix* verstärkt gebildet werden<sup>66</sup>. Überraschenderweise erfolgte eine wesentlich stärkere Aktivierung des Stoffwechsels durch den Extrakt schwefelhaltiger Braunkohle. Dabei konnte auf dem tschechischen Braunkohleextrakt (Schwefelgehalt: 4%) eine wesentlich stärkere Reaktion beobachtet werden als auf dem Extrakt standortrelevanter, schwefelarmer Braunkohle aus Ostbayern (Dechbetten, Regensburg)<sup>96,103</sup>. Diese Beobachtungen verbunden mit der CTC-Reduktion der SM1-Archaeen in den Schwefelansätzen lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung des Stoffwechsels von dem Schwefelgehalt der Braunkohle abhängt. Ein Wachstum auf Braunkohleextrakt konnte auch schon bei der Gattung *Thermoplasma*

beobachtet werden, wobei jedoch das eigentliche Substrat nicht näher identifiziert werden konnte (Prof. K. O. Stetter; pers. Mitt.). Der positive Nachweis auf Braunkohle deutet in Verbindung mit dem Auftreten der gallertartigen Aggregate direkt in den Quelltöpfen auf ein Vorkommen der SM1-Archaeen auch in tieferen Erdschichten hin. Dort wird aus braunkohlehaltigen Schichten der für die Schwefelquellen typische Schwefelwasserstoff freigesetzt<sup>17</sup>.

Aufgrund ihrer Einzigartigkeit stellen archaeele Lipidstrukturen wichtige Biomarker dar, die Anwesenheit und Aktivität spezifischer Mikroorganismen widerspiegeln. Neben Untersuchungen zu den physiologischen Eigenschaften der SM1-Archaeen ist die Zusammensetzung der Membranlipide von besonderem Interesse. Im Fall des SM1-Archaeons konnte mit Archaeol ein weit verbreitetes Membranlipid nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in den Analysen noch eine Vielzahl weiterer, unbekannter Verbindungen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich darunter weitere, bisher unbekannte Lipide befinden, die vielleicht sogar einen Biomarker der SM1-Gruppe darstellen könnten. Möglicherweise können dann auch einige in Niedertemperaturbiotopen nachgewiesenen Lipide den SM1-Archaeen zugeordnet werden<sup>77,159</sup>.

Desweiteren konnten auch molekulare Daten aus den hochreinen Fraktionen und der gallertartigen Aggregate der SM1-Archaeen gewonnen werden. So gelang es im Fall der SM1-Archaeen erstmals den G+C-Gehalt (35 mol%) eines unkultivierten Mikroorganismus zu bestimmen, was eine grundlegende Voraussetzung für eine spätere Gesamtgenomsequenzierung darstellt. Bis heute sind ungefähr 100 Totalgenomsequenzen von bakteriellen und archaeeen Reinkulturen bekannt<sup>175</sup>. Daraus konnten Informationen abgeleitet werden, die zu fundamentalen Einblicken in die Genomorganisation und in die Entwicklung des Lebens führten<sup>122,198,199</sup>. So zeigte sich beispielsweise, dass der domänenübergreifende, laterale Gentransfer eine weit größere Bedeutung hat als bislang vermutet<sup>12,48,54</sup>. Demnach besitzen 24% der Gene von dem Bakterium *Thermotoga maritima* eine größere Homologie zu archaeeen als zu bakteriellen Genen<sup>121</sup>. Ein ideales Umfeld für einen horizontalen Gentransfer bietet sich auch in den definierten Perlenkettenstrukturen zwischen den hauptsächlich am Perlenaufbau beteiligten Partnern aus zwei unterschiedlichen Domänen.

Trotz großer Anstrengungen war es bisher allerdings noch nicht möglich, die Gesamtgenomsequenz eines unkultivierten Mikroorganismus zu erhalten<sup>140,156</sup>. Nicht zuletzt das beständige Widerstehen von Kultivierungsversuchen lässt das Interesse an Gesamtgenomen dieser unkultivierten Mikroorganismen weiter wachsen. Komplexe Informationen durch den Erhalt des Gesamtgenoms können zwar nur bedingt Hinweise zur

Kultivierung völlig unbekannter Organismen liefern <sup>140</sup>, im Falle des greifbaren SM1-Archaeons aber entscheidend dazu beitragen. Neben stoffwechselrelevanten Einblicken könnten damit auch die ökologische Funktion und die charakteristische Ultrastruktur der SM1-Archaeen auf DNA-, RNA- und Proteinebene näher untersucht werden <sup>54</sup>. Durch wiederholtes Sequenzieren des SM1-Gesamtgenoms könnte zum ersten Mal die Schrittgeschwindigkeit der Evolution in der Natur direkt nachgewiesen werden. Evolutionsstudien an Laborkulturen von *Escherichia coli* zeigten Polymorphismen im Genom nach 10.000 Überimpfungen <sup>104,134</sup>. Darüber hinaus handelt es sich bei dem SM1-Archaeon um das erste unkultivierte Archaeum, das aus der Natur in hoher Reinheit gewonnen werden kann. Aus diesem Grund stellt es ein hervorragendes Modellsystem für Gesamtgenomanalysen dar und würde erstmalig die Möglichkeit bieten, Beobachtungen an Laborkulturen mit einem freilebenden „Modellorganismus“ zu vergleichen.

## V. Zusammenfassung

In den kalten Schwefelquellen (10°C) des Sippenauer Moores konnten erstmals frei flotierende, mikrobielle Zellverbände mit dem Aussehen einer Perlenkette nachgewiesen werden. Eine Perlenkette besteht dabei aus einem weißlichen Faden (Länge bis 15 cm), an dem bis zu 15 weiße Perlen ( $\varnothing$  0,5 – 3 mm) aufgereiht sind. Durch eine Kombination molekularer Analysen mit mikroskopischen Methoden konnte der einzigartige Aufbau dieser Perlenketten aufgeklärt werden. Filamentöse Schwefelbakterien, vornehmlich einer neuen Art der Gattung *Thiothrix* angehörend, sind am Aufbau der Perlenhülle sowie des Fadens zwischen den Perlen maßgeblich beteiligt. Das Innere einzelner Perlen besteht nahezu ausnahmslos aus neuartigen, unkultivierten Archaeen einer Spezies mit kokkenförmiger Morphologie ( $\varnothing$  0,6  $\mu$ m), die in eine Polymermatrix unbekannter Zusammensetzung eingebettet sind. Innerhalb dieser Matrix scheint dieser als SM1-Archaeon bezeichnete Organismus mit einem definierten Zell/Zell-Abstand dreidimensional angeordnet zu sein.

Nähere Untersuchungen zur phylogenetischen Position der SM1-Archaeen zeigten, dass sie innerhalb der *Euryarchaeota* einen phylogenetischen Abzweig mindestens auf Familienebene mit einem phylogenetischen Abstand von über 20% zu den nächsten kultivierten Vertretern (Gattungen *Thermoplasma* und *Picrophilus*) bilden. Basierend auf den phylogenetischen Daten konnte eine SM1-spezifische Gensonde (SMARCH714) konstruiert werden, mit der in Umweltanalysen durch FISH-Untersuchungen die neuartigen SM1-Archaeen gezielt und schnell identifiziert werden konnten. Parallel dazu wurde unter Berücksichtigung aller bisher bekannten archaeellen Sequenzen ein Sondengemisch (ARCH-Mix) entwickelt und verifiziert, das einen umfassenderen FISH-Nachweis insbesondere von unkultivierten Archaeen in Umweltproben ermöglicht. Eine Überprüfung dieser Hybridisierungssignale in Umweltproben auf DNA-Ebene ist mit Hilfe eines Laserkatapults möglich. Für eine derartige Anwendung eines Laserkatapults konnten Grundlagen geschaffen werden, die auf Einzelzellebene eine direkte Kopplung von FISH-Untersuchungen mit phylogenetischen Analysen zulassen.

Durch Untersuchungen weiterer Schwefelquellen in Bayern gelang es, die charakteristischen Perlenketten mit ihrem typischen Aufbau an vier weiteren Standorten nachzuweisen. Phylogenetische Analysen an fünf ausgewählten Schwefelquellen, die keine Perlenkettenstrukturen enthielten, zeigten das Vorkommen von weiteren, unkultivierten Archaeen. Neben Klonsequenzen mit naher Verwandtschaft zu unkultivierten, psychrophilen *Crenarchaeota*, sowie zu bereits kultivierten methanogenen Archaeen konnten in allen

Schwefelquellen Vertreter einer neuen SM1-Sequenzgruppe identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Klonsequenzen, die mit dem SM1-Archaeon der Perlenketten ein Sequenzkluster bilden, aber zueinander größtenteils phylogenetische Abstände mindestens auf Gattungsebene besitzen. Die Bedeutung der SM1-Gruppe in verschiedensten Schwefelquellen wird durch den Nachweis mehrerer Vertreter an einer warmen, marinen Schwefelquelle (37°C) in der Türkei unterstrichen.

In den Schwefelquellen des Sippenauer Moores konnte das Vorkommen der neuartigen SM1-Archaeen in der domänenübergreifenden Gemeinschaft der Perlenketten über einen Zeitraum von 30 Monaten nachgewiesen werden. Einblicke in deren Lebensbedingungen der SM1-Archaeen im Biotop wurden durch die Messung chemischer und physikalischer Parameter gewonnen. Die Bedingungen im Perleninneren direkt im Mikrohabitat der SM1-Archaeen konnten mit Optoden ( $\varnothing$  20  $\mu$ m) vor Ort festgestellt werden.

Durch das reproduzierbare Auffinden der Perlenkettenstrukturen in Verbindung mit einer selektiven Anreicherung der SM1-Archaeen konnten Fraktionen mit >98% archaeellem Zellanteil gewonnen werden, die für molekulare Analysen eingesetzt werden konnten. Hierbei wurde erstmals der GC-Gehalt eines Gesamtgenoms für einen unkultivierten Mikroorganismus (35% GC) ermittelt. Bei der Lipidanalyse aus den hochreinen Fraktionen konnte Archaeol identifiziert werden.

Darüber hinaus war es möglich, einen Einblick in die Physiologie dieser unkultivierten Archaeen durch Untersuchungen verschiedener, stoffwechselrelevanter Parameter zu gewinnen. Dabei konnte an hochreinen Fraktionen der unkultivierten SM1-Archaeen (Reinheit >98%) gezeigt werden, dass ihnen typische Stoffwechselmarker für die Methanogenese und die Sulfatreduktion fehlen. Zur weiteren Aufklärung des Stoffwechsels unkultivierter Mikroorganismen wurde als neues Werkzeug eine Färbung durch den Fluoreszenzfarbstoff CTC ausgearbeitet. Hiermit konnte für die SM1-Archaeen eine sehr starke Aktivierung des Stoffwechsels durch den Extrakt schwefelhaltiger Braunkohle gezeigt werden. Zugleich handelt es sich hierbei um den ersten nachgewiesenen Stoffwechselumsatz eines Vertreters dieser neuartigen SM1-Gruppe unkultivierter *Archaea*.

## VI. Literaturverzeichnis

1. **Abele, G.** Die Heil- und Mineralquellen Südbayerns. [2]. 1950. Geologica Bavarica. Bayerisches Geologisches Landesamt.
2. **Amann, G.** Ganzzellhybridisierung und ihre Problematik am Beispiel der Korarchaeota. 2000. Dissertation. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg.
3. **Amann, R., F.-O. Glöckner, und A. Neef.** 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiol. Rev. **20**:191-200.
4. **Amann, R. I.** 1995. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Molecular Ecology **4**:543-554.
5. **Amann, R. I.** 1995. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes p. 1-15. In A. D. L. Akkermans, Van Elsas J.D., and De Bruijn F.J. (eds.), Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
6. **Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, und D. A. Stahl.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1919-1925.
7. **Amann, R. I., L. Krumholz, und D. A. Stahl.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172**:762-770.
8. **Amann, R. I. und W. Ludwig.** 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. **24**:555-565.
9. **Amann, R. I., W. Ludwig, und K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**:143-169.
10. **Andres, G. und M. Geyh.** 1981. Isotopenhydrogeologische Verhältnisse, p. 92-98. In G. Andres und H. Wirth (eds.), Die Thermal und Schwefelwasservorkommen von Bad Gögging. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
11. **Apel, R.** 1978. Hydrogeologische Verhältnisse, p. 335-343. In K. H. Weber (ed.), Erläuterungen zum Blatt Nr. 7137 Abensberg. Bayerisches Geologisches Landesamt, München.
12. **Aravind, L., R. L. Tatusov, Y. I. Wolf, D. R. Walker, und E. V. Koonin.** 1998. Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. TIG **14**:442-444.
13. **Aruga, S., Y. Kamagata, T. Kohno, S. Hanada, K. Nakamura, und T. Kanagawa.** 2002. Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**:1309-1316.
14. **Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer, und N. R. Pace.** 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:9188-9193.
15. **Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries, und N. R. Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:1609-1613.
16. **Bartosch, S., R. Mansch, K. Knötzsch, und E. Bock.** 2003. CTC staining and counting of actively respiring bacteria in natural stone using confocal laser scanning microscopy. J. Microbiol. Methods **52**:84.
17. **Baumann, M.** 1981. Hydrogeologische, hydrochemische und erschließungstechnische Verhältnisse der Schwefelquellen, p. 4-13. In G. Andres und H. Wirth (eds.), Die Thermal- und Schwefelwasservorkommen von Bad Gögging. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.



18. **Ben-Ari, E. T.** 1999. Not just slime. *Bioscience* **49**:689-695.
19. **Bland, J. A. und J. T. Staley.** 1978. Observations on the biology of *Thiothrix*. *Arch. Microbiol.* **117**:79-87.
20. **Blöchl, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch, und K. O. Stetter.** 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of *Archaea*, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**:14-21.
21. **Boetius, A., K. Ravensschlag, C. J. Schubert, D. Rickert, F. Widdel, A. Gieseke, R. Amann, B. B. Jorgensen, U. Witte, and O. Pfannkuche.** 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**:623-626.
22. **Bradshaw, D. J., P. D. Marsh, G. K. Watson, und C. Allison.** 1998. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aggregation. *Infect. Immun.* **66**:4729-4732.
23. **Bresinsky, A.** 1991. Flora und Vegetation der ältesten Schutzgebiete im Umkreis von Regensburg. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Bot. Ges.* **50**:121-150.
24. **Bresinsky, A.** 1999. Die Verteidigung des Naturschutzgebietes Sippenauer Moor. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Bot. Ges.* **60**:691-724.
25. **Bresinsky, A.** 2001. Das Schicksal des Sippenauer Moores nach Abschluss des Verfahrens vor dem Bayerischen Gerichtshof. *Hoppea, Denkschr. Regensb. Bot. Ges.* **62**:367-391.
26. **Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly, und R. L. Weiss.** 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**:54-68.
27. **Brosius, J., J. L. Palmer, J. P. Kennedy, und H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4801-4805.
28. **Buick, R. und A. H. Knoll.** 1999. Acritarchs and microfossils from the mesoproterozoic Bangemall Group, Northwestern Australia. *J. Palentol.* **73**:744-764.
29. **Burggraf, S., P. Heyder, und N. Eis.** 1997. A pivotal *Archaea* group. *Nature* **385**:780.
30. **Burggraf, S., H. Huber, und K. O. Stetter.** 1997. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S ribosomal RNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:657-660.
31. **Burggraf, S., T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauer, C. R. Woese, und K. O. Stetter.** 1994. Identifying members of the domain *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3112-3119.
32. **Burggraf, S., G. J. Olsen, K. O. Stetter, und C. R. Woese.** 1992. A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. *System. Appl. Microbiol.* **15**:352-356.
33. **Carlé, W.** 1975. Die Mineral- und Thermalwässer von Mitteleuropa. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
34. **Casamayor, E. O., H. Schäfer, L. Baneras, C. Pedrós-Alió, und G. Muyzer.** 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighbouring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:499-508.
35. **Chicurel, M.** 2000. Slimebusters. *Nature* **408**:284-286.
36. **Cohn, F.** 1875. Untersuchungen über Bacterien, II. Beiträge z. Biol. d. Pflanzen **1**:141-207.
37. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, und H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**:711-745.

38. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, und E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent Infections. *Science* **284**:1318-1322.
39. **Daims, H., A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer, und M. Wagner.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* **22**:434-444.
40. **Daims, H., U. Purkhold, L. Bjerrum, E. Arnold, P. A. Wilderer, und M. Wagner.** 2001. Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: Lessons from molecular approaches. *Wat. Sci. Tech.* **43**:9-18.
41. **Davey, M. E. und G. A. O'Toole .** 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:847-867.
42. **DeLong, E. F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5685-5689.
43. **DeLong, E. F.** 1998. Archaeal means and extremes. *Science* **280**:542-543.
44. **DeLong, E. F., L.-L. King, R. Massana, H. Cittone, A. Murray, C. Schleper, und S.-G. Wakeham.** 1998. Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1133-1138.
45. **DeLong, E. F., L. T. Taylor, T. L. Marsh, und C. M. Preston.** 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5554-5563.
46. **DeLong, E. F., G. S. Wickham, und N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**:1360-1363.
47. **DeLong, E. F., K. Y. Wu, B. B. Prézelin, und R. V. M. Jovine.** 1994. High abundance of archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**:695-697.
48. **Doolittle, R. F.** 1997. Microbial genomes opened up. *Nature* **392**:339-342.
49. **Dt.Landesvermessung. TOP50.** 1998. Daimler Benz Aerospace, Dornier.
50. **Dul'tseva, N. M. und G. A. Dubinina.** 1994. *Thiothrix arctophila* sp. nov. - a new species of filamentous colorless sulfur bacteria. *Microbiology* **63**:147-153.
51. **Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lambert, K. Vido, P. Gaudu, Y. LeLoir, F. Violet, P. Loubière, und A. Gruss.** 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* **183**:4509-4516.
52. **Eder, W., W. Ludwig, und R. Huber.** 1999. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea. *Arch. Microbiol.* **172**:213-218.
53. **Embley, T. M., B. J. Finlay, R. H. Thomas, und P. L. Dyal.** 1992. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1479-1487.
54. **Faguy, D. M. und R. F. Doolittle.** 1999. Genomics: Lessons from the *Aeropyrum pernix* genome. *Curr. Biol.* **9**:R883-R886.
55. **Farrelly, V., F. A. Rainey, und E. Stackebrandt.** 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2798-2801.
56. **Ferguson, R. L., E. N. Buckley, und A. V. Palumbo.** 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:49-55.
57. **Fink, L., T. Kinfe, W. Seeger, L. Ermert, W. Kummer, und R. M. Bohle.** 2000. Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation. *Am. J. Pathol.* **157**:1459-1466.

58. **Fink, L., S. Kohlhoff, M. M. Stein, J. Hänze, N. Weissmann, F. Rose, E. Akkayagil, F. Grimminger, W. Seeger, und R. M. Bohle.** 2002. cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am. J. Pathol.* **160**:81-90.
59. **Franzmann, P. D., Y. Liu, D. L. Balkwill, H. C. Aldrich, E. Conway de Macario, und D. R. Boone.** 1997. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H<sub>2</sub>-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1068-1072.
60. **Franzmann, P. D., N. Springer, W. Ludwig, E. Conway de Macario, und M. Rohde.** 1992. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica. *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* **15**:573-581.
61. **Friedrich, A. B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch, und U. Hentschel.** 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridisation. *Marine Biology* **134**:461-470.
62. **Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwiapl, W. Ludwig, und R. Amann.** 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4973-4982.
63. **Fuhrman, J. A., K. McCallum, und A. A. Davis.** 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**:148-149.
64. **Fuhrman, J. A. und C. C. Ouverney.** 1998. Marine microbial diversity studied via 16S rRNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native archaea with fluorescent single cell probes. *Aquatic Ecology* **32**:3-15.
65. **Gaudu, P., K. Vido, B. Cesselin, S. Kulakauskas, J. Tremblay, L. Rezaiki, G. Lamberet, S. Sourice, P. Duwat, und A. Gruss.** 2002. Repiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:263-269.
66. **Grabovich, M. Y., G. A. Dubinina, N. M. Dul'tseva, und V. V. Churikova.** 1996. Peculiarities of carbon metabolism in the filamentous sulfur bacteria *Thiothrix arctophila* and *Leucothrix thiophila* during chemolitho- and chemoorganoheterotrophic growth. *Microbiology: a translation of Mikrobiologiya* **65**:129-133.
67. **Graf, J. B.** 1805. Versuch einer pragmatischen Geschichte der baierischen und oberpfälzischen Mineralwässer. Lindauer und Lentner, München.
68. **Grey, K. und I. R. Williams.** 1990. Problematic bedding-plane markings from the Middle Proterozoic Manganese Subgroup, Bangemall Basin, Western Australia. *Precambrian Res.* **46**:307-327.
69. **Großkopf, R., P. H. Janssen, und W. Liesack.** 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.
70. **Großkopf, R., S. Stubner, und W. Liesack.** 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4983-4989.
71. **Gundersen, J. K., B. B. Jorgensen, E. Larsen, und H. W. Jannasch.** 1992. Mats of giant sulphur bacteria on deep- sea sediments due to fluctuating hydrothermal flow. *Nature* **360**:454-456.
72. **Hartzell, P. L., J. Millstein, und C. LaPaglia.** 1999. Biofilm formation in hyperthermophilic archaea, p. 335-349. *In* R. J. Doyle (ed.), Academic Press, San Diego, California, USA.
73. **Haunschild, H. und H. Jerz.** 1981. Erläuterungen zur Geologischen Karte von Bayern 1:500 000. Bayerisches Geologisches Landesamt, München.
74. **Henneberger, R.** Molekulare und physiologische Untersuchungen an mikrobiellen Lebensgemeinschaften an trägergebundenen Materialien. 2002. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.

75. **Henrici, A. T.** 1933. Studies of freshwater bacteria. *J. Bacteriol.* **25**:277-287.
76. **Hershberger, K. L., S. M. Barns, A.-L. Reysenbach, S. C. Dawson, und N. R. Pace.** 1996. Wide diversity of crenarchaeota. *Nature* **384**:420.
77. **Hoefs, M. J. L., S. Schouten, J. W. De Leeuw, L. L. King, S. G. Wakeham, und J. S. S. Damsté.** 1997. Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3090-3095.
78. **Horodyski, R. J.** 1982. Problematic bedding-plane markings from the Middle Proterozoic Appekunny Argillite, Belt Supergroup, Northwestern Montana. *J. Paleontol.* **56**:882-889.
79. **Howarth, R., R. F. Unz, E. M. Seviour, R. J. Seviour, L. L. Blackall, R. W. Pickup, J. G. Jones, J. Yaguchi, und I. M. Head.** 1999. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater- treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1817-1827.
80. **Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer, und K. O. Stetter.** 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**:63-67.
81. **Huber, H., M. Thomm, H. König, G. Thies, und K. O. Stetter.** 1982. *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch. Microbiol.* **132**:47-50.
82. **Huber, R.** 1999. Die Laserpinzette als Basis für Einzelzellkultivierungen. *BIOspektrum* **5**:289-291.
83. **Huber, R., S. Burggraf, T. Mayer, S. M. Barns, P. Rossnagel, und K. O. Stetter.** 1995. Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis. *Nature* **376**:57-58.
84. **Huber, R., W. Eder, S. Heldwein, G. Wanner, H. Huber, R. Rachel, und K. O. Stetter.** 1998. *Thermocrinis ruber* gen. nov., sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3576-3583.
85. **Huber, R., T. Wilharm, D. Huber, A. Trincone, S. Burggraf, H. König, R. Rachel, I. Rockinger, H. Fricke, und K. O. Stetter.** 1992. *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **15**:340-351.
86. **Hugenholtz, P. und N. R. Pace.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**:190-197.
87. **Jukes, T. H. und C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.
88. **Jurgens, G., F.-O. Glöckner, R. Amann, A. Saano, L. Montonen, M. Likolammi, und U. Münster.** 2000. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:45-56.
89. **Jurgens, G., K. Lindström, und A. Saano.** 1997. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:803-805.
90. **Kaiser, D. und R. Losick.** 1993. How and why bacteria talk to each other. *Cell* **73**:873-885.
91. **Karner, M. B., E. F. DeLong, und D. M. Karl.** 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**:507-510.
92. **Kates, M.** 1993., p. 261-295. In M. Kates, D. J. Kushner, und A. T. Matheson (eds.), *The biochemistry of archaea (archaeobacteria)*.
93. **Kato, C., L. Li, J. Tamaoka, und K. Horikoshi.** 1997. Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles* **1**:117-123.

94. **Koch, M.** Verbreitung und molekulare Analysen von charakteristisch strukturierten mikrobiellen Lebensgemeinschaften. 2001. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
95. **Konradt, T.** Biochemische und physiologische Untersuchungen an charakteristisch strukturierten, mikrobiellen Lebensgemeinschaften sulfidischer Niedertemperatur-Ökosysteme. 2001. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
96. **Kraus, L.** 1969. Erdöl- und Erdgaslagerstätten im ostbayerischen Molassebecken. Erdöl-Erdgas-Z. **85**:442-454.
97. **Krizek, V.** 1990. Kulturgeschichte des Heilbades. Kohlhammer, Stuttgart.
98. **Kudo, Y., S. Shibata, T. Miyaki, T. Aono, und H. Oyaizu.** 1997. Peculiar archaea found in Japanese paddy soils. Biosci. Biotech. Biochem. **61**:917-920.
99. **Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt und M. Goodfellow (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, England.
100. **Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, und N. R. Pace.** 1985. Rapid determination of 16 S Ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:6955-6959.
101. **Larkin, J. M. und D. L. Shinabarger.** 1983. Characterization of *Thiothrix nivea*. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**:841-846.
102. **Lathe, R.** 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. J. Mol. Biol. **183**:1-12.
103. **Lemcke, K.** 1981. Gedanken zur Schwefelanreicherung zwischen Neustadt a.d. Donau und Regensburg, p. 53-55. In G. Andres und H. Wirth (eds.), Die Thermal und Schwefelwasservorkommen von Bad Gögging. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
104. **Lenski, R. E. und M. Travisano.** 2002. Dynamics of adaptation and diversification: A 10,000-generation experiment with bacterial populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:6808-6814.
105. **Ludwig, W.** 1995. Sequence databases, p. 1-22. In A. D. L. Akkermans, J. D. Van Elsas, und F. J. De Bruijn (eds.), Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
106. **Ludwig, W. und O. Strunk.** 1997. ARB: A software environment for sequence data. [www.arb-home.de](http://www.arb-home.de).
107. **Luria, S. E., J. N. Adam, und R. C. Teng.** 1960. Transduction of lactose utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. Virology **12**:348-390.
108. **Mah, T.-F. C. und G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. **9**:34-39.
109. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, und K.-H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. System. Appl. Microbiol. **15**:593-600.
110. **Margot, H., C. Acebal, E. Toril, R. Amils, und J. L. Fernandez Puentes.** 2002. Consistent association of crenarchaeal archaea with sponges of the genus *Axinella*. Marine Biology **140**:739-745.
111. **Massana, R., L. T. Taylor, A. E. Murray, K. Y. Wu, W. H. Jeffrey, und E. F. DeLong.** 1998. Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic archaea in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. Limnol. Oceanogr. **43**:607-617.
112. **Massol-Deya, A. A., J. Whallon, R. F. Hickey, und J. M. Tiedje.** 1995. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. Appl. Environ. Microbiol. **61**:769-777.

113. **McGregor, B. J., D. P. Moser, E. W. Alm, K. H. Nealson, und D. A. Stahl.** 1997. Crenarchaeota in Lake Michigan Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1178-1181.
114. **McInerney, J. O., M. Mullarkey, M. E. Wernecke, und R. Powell.** 1997. Phylogenetic analysis of Group I marine archaeal rRNA sequences emphasizes the hidden diversity within the primary group Archaea. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**:1669.
115. **McInerney, J. O., M. Wilkinson, J. W. Patching, T. M. Embley, und R. Powell.** 1995. Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a Deep-Sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1646-1648.
116. **Michaelis, W., R. Seifert, K. Nauhaus, T. Treude, V. Thiel, M. Blumenberg, K. Knittel, A. Gieseke, K. Peterknecht, T. Pape, A. Boetius, R. Amann, B. B. Jorgensen, F. Widdel, J. Peckmann, N. V. Pimenov, und M. B. Gulin.** 2002. Microbial reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**:1013-1015.
117. **Miller, M. B. und B. L. Bassler.** 2001. Quorum sensing in Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**:165-199.
118. **Moissl, C., C. Rudolph, und R. Huber.** 2002. Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:933-937.
119. **Moissl, C.** Ökophysiologische Untersuchungen an Populationen neuartiger Mikroorganismen in sulfidhaltigen Quellen. 2000. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
120. **Murray, A. E., C. M. Preston, R. Massana, L. T. Taylor, A. Blakis, K. Wu, und E. F. DeLong.** 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2585-2595.
121. **Nelson, K. E., J. A. Eisen, und C. M. Fraser.** 2001. Genome of *Thermotoga maritima* MSB8, p. 169-180. *In* M. W. W. Adams and R. M. Kelly (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego.
122. **Nelson, K. E., I. T. Paulsen, und C. M. Fraser.** 2001. Microbial genome sequencing: a window into evolution and physiology. *ASM News* **67**:310-317.
123. **Nestler, K.** 1994. Die Sage von der Katzenmühle zu Cunersdorf. *Ortschronik von Cunersdorf*.
124. **Nielsen, H.** 1981. Schwefelisotope und ihre Aussage zur Entstehung der Schwefelquellen, p. 99-107. *In* G. Andres und H. Wirth (eds.), *Die Thermal und Schwefelwasservorkommen von Bad Gögging*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
125. **Nübel, U., M. M. Bateson, V. Vandiecken, A. Wieland, M. Kühl, und D. M. Ward.** 2002. Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse *Chloroflexaceae*-related bacteria in hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4593-4603.
126. **O'Toole, G. A., H. B. Kaplan, und R. Kolter.** 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49-79.
127. **Odintsova, E. V. und G. A. Dubinina.** 1990. A new filamentous sulfur bacterium *Thiothrix ramosa* nov.sp. *Microbiology: a translation of Mikrobiologiya* **59**:437-445.
128. **Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, und D. A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:337-365.
129. **Orphan, V. J., C. H. House, K.-U. Hinrichs, K. D. McKeegan, und E. F. DeLong.** 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7663-7668.
130. **Ouverney, C. C. und J. A. Fuhrman.** 2000. Marine planctonic archaea take up amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4829-4833.



131. **Pace, N. R.** 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**:463-470.
132. **Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**:734-740.
133. **Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, und G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbiol. Ecol.* **9**:1-55.
134. **Papadopoulos, D., D. Schneider, J. Meier-Eiss, W. Arber, R. E. Lenski, und M. Blot.** 1999. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3807-3812.
135. **Pax, F. und K. Wulfert.** 1941. Die Rotatorien deutscher Schwefelquellen und Thermen. *Arch. Hydrobiol.* **38**:165-213.
136. **Pearl, H. W. und J. L. Pinckney.** 1996. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* **31**:225-247.
137. **Pierson, B. K. und M. N. Parenteau.** 2000. Phototrophs in high iron microbial mats: microstructure of mats in iron-depositing hot springs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:181-196.
138. **Preston, C. M., K. Y. Wu, T. F. Molinski, und E. F. DeLong.** 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6241-6246.
139. **Puchelt, H.** 1967. Schwefelisotopenuntersuchungen an österreichischen und deutschen Schwefelquellen. *Archiv f. physik. Therapie* **19**:357-365.
140. **Quaiser, A., T. Ochsenreiter, H. P. Klenk, A. Kletzin, A. H. Treusch, G. Meurer, J. Eck, C. W. Sensen, und C. Schleper.** 2002. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environ. Microbiol.* **4**:603-611.
141. **Quelle-Buch.** 1959. Das neue Lexikon Bd. II. SÜD-WEST Verlag, München.
142. **Quentin, K. E.** Die Heil- und Mineralquellen Nordbayerns. 1970. *Geologica Bavarica*. Bayerisches Geologisches Landesamt.
143. **Rabenhorst, L.** 1848. Die Algen Sachsens, resp. Mitteleuropas. Dec. 1-100. *Algen Europas* Dec. 1-104 (101-204), no. 1-1000. Exsikkate und Begleittext. 1848/1860. Dresden.
144. **Rabenhorst, L.** 1865. *Flora Europea Algarum - Aquae dulcis et submarinae: Sectio II - Algas phycochromaceas complectens*. Verlag von Eduard Kummer, Leipzig.
145. **Ramakrishnan, B., T. Lueders, P. F. Dunfield, R. Conrad, und M. W. Friedrich.** 2001. Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**:175-186.
146. **Ravenschlag, K., K. Sahm, und R. Amann.** 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:387-395.
147. **Reindl, J. und S. Föckersperger.** 1965. *Bad Gögging - Geschichte und Führer*. Gemeinde Bad Gögging, Bad Gögging.
148. **Reysenbach, A.-L., L. J. Giver, G. S. Wickham, und N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3417-3418.
149. **Rieger, G.** 1954. *Kelheimer Heimatbuch für die Stadt und den Landkreis Kelheim*.
150. **Rittmann, B. E., M. Pettis, H. Reeves, und A. D. Stahl.** 1999. How biofilm clusters affect substrate flux and ecological selection. *Wat. Sci. Tech.* **39**:99-105.

151. **Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, und K.-H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849-2858.
152. **Rossgoderer, L.** 1981. Geschichte und Entwicklung des Schwefelbades, p. 1-3. *In* G. Andres und H. Wirth (eds.), *Die Thermal und Schwefelwasservorkommen von Bad Gögging*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
153. **Rudolph, C.** Weiterführende Untersuchungen zur Mikrobenpopulation der Schwefelquellen des Sippenauer Moores. 1998. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg.
- 153a. **Rudolph, C., G. Wanner, and R. Huber.** 2001. Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2336-2344.
154. **Sambrook, J.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
155. **Schink, B.** 1991. Syntrophism among Prokaryotes, p. 276-299. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, und K.-H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, Berlin.
156. **Schleper, C., E. F. DeLong, C. M. Preston, R. A. Feldman, K. Y. Wu, und R. V. Swanson.** 1998. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **180**:5003-5009.
157. **Schleper, C., W. Holben, und H. P. Klenk.** 1997. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:321-323.
158. **Schleper, C., R. V. Swanson, E. J. Mathur, und E. F. DeLong.** 1997. Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **179**:7803-7811.
159. **Schouten, S., E. C. Hopmans, R. D. Pancost, und J. S. S. Damsté.** 2000. Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:14421-14426.
160. **Simankova, M. V., S. N. Parshina, T. P. Tourova, T. V. Kolganova, A. J. Zehnder, und A. N. Nozhevnikova.** 2001. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *System. Appl. Microbiol.* **24**:362-367.
161. **Simon, H. M. und J. A. G. R. M. Dodsworth.** 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ. Microbiol.* **2**:495-505.
162. **Smith, J. J. und G. A. McFeters.** 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* **29**:161-175.
163. **Stahl, D. A.** 1997. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny, p. 102-114. *In* C. J. Hurst (ed.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, USA.
164. **Stahl, D. A. und R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. *In* E. Stackebrandt und M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
165. **Stein, J.-L., T. L. Marsh, K. Y. Wu, H. Shizuya, und E. F. DeLong.** 1996. Characterization of uncultivated procaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* **178**:591-599.
166. **Stetter, K. O.** 1994. The lesson of Archaeobacteria, p. 143-151. *In* S. Bengtson (ed.), *Nobel symposium No.84*. Columbia University Press, New York.

167. **Stetter, K. O.** 1995. Microbial life in hyperthermal environments. *ASM News* **61**:285-290.
168. **Stetter, K. O.** 1999. Extremophiles and their adaption to hot environments. *FEBS Lett.* **452**:22-25.
169. **Stickler, D.** 1999. Biofilms. *Current Opinion in Microbiology* **2**:270-275.
170. **Stickler, D. J.** 1996. Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling* **9**:293-305.
171. **Sturm, W. und Gruber, A.** Unsere Heimat. 1[1]. 1980. Heimatverein Bad Abbach e.V. Sagen und Geschichten, Spitznamen, aus Stammtischgesprächen.
172. **Sutherland, I. W.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**:3-9.
173. **Takai, K., D. P. Moser, M. DeFlaun, T. C. Onstott, und J. K. Fredrickson.** 2001. Archaeal diversity in waters from deep south african gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5750-5760.
174. **Thomas, T. und R. Cavicchioli .** 1998. Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett.* **439**:286.
175. **TIGR.** 2003. TIGR. The Institute for Genome Research. [www.tigr.org](http://www.tigr.org).
176. **Tourismus in Bayern.** 2001. Bayerisches Staatsministerium für Wirtschaft, Verkehr und Technologie.
177. **Ueda, T., Y. Suga, und T. Matsuguchi.** 1995. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. *European Journal of Soil Science* **46**:415-421.
178. **v.Gümbel, K. W.** 1894. Geologie von Bayern. Verlag von Theodor Fischer, Cassel.
179. **v.Wintzingerode, F., U. Göbel, und E. Stackebrandt.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR- based rRNA analysis. *Microbiol. Rev.* **21**:213-229.
180. **Van der Maarel, M. J. E. C., R. R. E. Artz, R. Haanstra, und L. J. Forney.** 1998. Association of marine archaea with the digestive tracts of two marine fish species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2894-2898.
181. **Vaneechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, und K. Kersters.** 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:227-234.
182. **Vetriani, C., H. W. Jannasch, B. J. MacGregor, A. D. Stahl, und A.-L. Reysenbach.** 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4375-4384.
183. **Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau, und D. A. Stahl.** 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* **180**:2975-2982.
184. **Wallhäuser, K. H. und H. Puchelt.** 1966. Sulfatreduzierende Bakterien in Schwefel- und Grubenwässern Deutschlands und Österreichs. *Contr. Miner. Petrol.* **13**:12-30.
185. **Ward, D. M., M. M. Bateson, R. Weller, und A. L. Ruff-Roberts.** 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microbiol. Ecol.* **12**:219-286.
186. **Warneke, M.** Die Flora und Vegetation des Naturschutzgebietes "Sippenauer Moor" im Landkreis Kelheim. 1992. Diplomarbeit Universität Regensburg, Lehrstuhl für Botanik.
187. **Watnick, P. und R. Kolter.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**:2675-2679.

188. **Weber, K. H.** Erläuterungen zum Blatt Nr. 7137 Abensberg. Bayerisches Geologisches Landesamt. 1978. München, Bayerisches Geologisches Landesamt. Geologische Karte von Bayern 1:25000. Bayerisches Geologisches Landesamt.
189. **Weller, R. und D. M. Ward.** 1989. Selective recovery of 16S rRNA sequences from natural microbial communities in the form of cDNA. Appl. Environ. Microbiol. **55**:1818-1822.
190. **Wimpenny, J., W. Manz, und U. Szewzyk.** 2000. Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbiol. Rev. **24**:661-671.
191. **Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:513-523.
192. **Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:529-539.
193. **Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:569-576.
194. **Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:585-594.
195. **Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:489-507.
196. **Winogradsky, S.** 1887. Ueber Schwefelbakterien. Botanische Zeitung **45**:545-559.
197. **Winogradsky, S.** Heft I: Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. 1888. Leipzig, Verlag von Arthur Felix. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien.
198. **Woese, C. R.** 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:8392-8396.
199. **Woese, C. R.** 2002. On the evolution of cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:8742-8747.
200. **Woese, C. R., L. Achenbach, P. Rouviere, und L. Mandelco.** 1991. Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. System. Appl. Microbiol. **14**:364-371.
201. **Woese, C. R. und G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5088-5090.
202. **Woese, C. R., O. Kandler, und M. L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:4576-4579.
203. **Yu, W., W. K. Dodds, M. K. Banks, J. Skalsky, und E. A. Strauss.** 1995. Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. Appl. Environ. Microbiol. **61**:3367-3372.
204. **Zarnkow, U.** Analyse zur Mikrobienpopulation der Schwefelquellen des Sippenauer Moors. 1998. Diplomarbeit. Universität Regensburg, Lehrstuhl für Mikrobiologie.
205. **Zhang, L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi, und N. Arnheim.** 1992. Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:5847-5851.
206. **Zinkhan, D. M. und R. K. Thauer.** 1990. Anaerobic lactate oxidation to 3 CO<sub>2</sub> by *Archaeoglobus fulgidus* via carbon monoxide dehydrogenases pathway: demonstration of the acetyl-CoA carbon-carbon cleavage reaction in cell extracts. Arch. Microbiol. **153**:215-218.
207. **ZoBell, C. E. und C. E. Allen.** 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. J. Bacteriol. **29**:239-251.

Bedanken möchte ich mich bei ...

- ... **Prof. Dr. Robert Huber** für die Vergabe dieses hochinteressanten Themas. Sein motivierendes Interesse an dieser Arbeit, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die vielen fachlichen Ratschläge trugen erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Seine freundschaftliche und motivierende Art werden mir stets in lebhafter Erinnerung bleiben.
- ... **Prof. Dr. Karl O. Stetter** für sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und das stets offene Ohr für meine Anliegen. Die vielen fachlichen Diskussionen waren mir immer ein Ansporn.
- ... **Prof. Dr. Andreas Bresinsky** für sein Interesse an diesem Thema und für seinen unermüdlichen Einsatz für den Erhalt des Sippenauer Moores mit seinen Schwefelquellen.
- ... **Prof. Dr. Roger Summons** und **Prof. Dr. Gerhard Wanner** für die interessante Zusammenarbeit bei Lipidanalysen und Rasterelektronenmikroskopie.
- ... allen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe Robert Huber** - insbesondere **André Antunes, Marietta Bock, Wolfgang Eder, Imke Haller, Ruth Henneberger, Marcus Koch, Christine Moissl** - für ihre freundliche Hilfsbereitschaft (besonders in den letzten Stunden vor Abgabe dieser Arbeit...) und das prima Laborklima. Nicht nur das Arbeiten mit Euch war ein konstruktives Vergnügen!
- ... allen anderen **Mitgliedern des Lehrstuhls**, deren Aufzählung hier den Rahmen sprengen würde, aber wegen der vielen hilfreichen Diskussionen, den netten Gesprächen und kleinen Tipps absolut notwendig wäre.
- ... all den **Ungenannten**, die mich dienstlich oder privat durch die Doktorarbeit begleiteten. Jeder hat auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!
- ... **Birgit Meinschmidt, meiner Mutter** und **Herbert Kalbfleisch**, die mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleiteten.